



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNE EN MALARIA SINTOMÁTICA
Y ASINTOMÁTICA POR *Plasmodium
falciparum* EN LA AMAZONÍA PERUANA**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

KATHERINE JÉSSICA TORRES FAJARDO

LIMA-PERÚ

2015

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS

DR. JOSE ESPINOZA BABILON (PRESIDENTE)

DRA. CRISTINA GUERRA GIRALDES (SECRETARIA)

DR. JORGE AREVALO ZELADA (VOCAL)

DR. ELEAZAR ANTUNEZ DE MAYOLO (VOCAL)

ASESORES:

PhD. Dionicia Gamboa

MD. Joseph Vinetz

DEDICATORIA

A mis maravillosos padres, Victor y Ana María, mis hermanos Eybe, Liliana, Jonny y

William por su apoyo y cariño.

A mi prima y amiga Martha Fernandez.

A mis hermosas sobrinas Angy, Iskra, Xiomara.

A Jéssica Muñoz por su amistad y cariño.

A Henry Castro por su amor y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a Dionicia Gamboa, amiga y asesora, gracias por la confianza y por enseñarme los pasos que debo tomar con tu ejemplo.

A Joseph Vinetz por cada oportunidad, su apoyo y dedicación con este trabajo de investigación.

A Paula Maguiña por todo lo compartido, por su amistad y todo el apoyo constante en mi Doctorado.

A los miembros de jurado por sus valiosas sugerencias y la dirección en la finalización del manuscrito.

A Elizabeth Villasis, Pamela Rodriguez y Carlos Castrillón, gracias por toda su ayuda, compromiso y los momentos compartidos.

A Freddy Alava, Daniel Sánchez y Roy Tenorio, las personas claves en Iquitos, gracias por su compromiso en este trabajo.

A cada miembro del Laboratorio de Malaria (308 y 309), a los que estuvieron y a los que aún están, gracias!.

A cada uno de los pacientes enrolados por su disposición a participar en un trabajo de investigación a pesar de sus circunstancias, gracias!!.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Este trabajo fue financiado principalmente por la Beca Fogarty Training Grant - D43TW007120 del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.
- Este trabajo fue también financiado por el Centro de Exelencia de Investigación en Malaria de la Amazonía (ICEMR) U19AI089681, del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.
- Este trabajo fue financiado en parte por la “International Society of Infectious Diseases” (ISID)- Small Grant.

ÍNDICE

INDICE

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

SUMMARY

CAPÍTULO 1: Introducción General	01
I.1. Generalidades	02
I.2. Malaria en el Perú	02
I.3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	06
I.4. Taxonomía	08
I.5. Malaria Asintomática	09
I.6. Respuesta Inmune en Malaria	12
II.6.1. Respuesta Inmune Innata	12
II.6.2. Respuesta Inmune Adaptativa	14
II.6.3. Estudios Previos de Comparación de la Respuesta Inmune en Sintomáticos y Asintomáticos con infección con <i>P. falciparum</i>	17
I.7. Justificación del Estudio	19
I.8. Objetivos de esta Tesis	20
I.8. Lugar y Población de Estudio	24
CAPÍTULO 2: Comparación de la respuesta <i>ex vivo</i> de PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con <i>Plasmodium falciparum</i> en fase aguda después de la estimulación con diferentes antígenos del parásito	26

CAPÍTULO 3: Análisis fenotípico y cuantitativo de las células dendríticas (CDs) y células T regulatorias (Tregs) obtenidas de individuos sintomáticos y asintomáticos durante la fase aguda de la infección por <i>P. falciparum</i>	64
CAPÍTULO 4: Identificación de proteínas altamente reactivas al suero de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con <i>P. falciparum</i> en la Amazonia Peruana utilizando microarreglos de proteínas	80
CAPÍTULO 5: Discusión General y Conclusiones	95
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	99
DATOS SUPLEMENTARIOS	108

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO 2

TABLA 1. Preparación de componentes para la digestión enzimática del ARN total con enzima TURBO™ DNase (2 U/μL) TURBO	38
TABLA 2. Preparación de componentes para la síntesis de ADNc con el kit de síntesis Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR.	39
TABLA 3. Secuencia de cebadores utilizados en PCR en Tiempo Real	40
TABLA 4. Preparación de componentes para la PCR en Tiempo Real	41
TABLA 5. Especificaciones y características de <i>tnf-α</i> , <i>ifn-γ</i> , <i>il-10</i> , <i>tgf-β</i> , y el gen del receptor <i>tlr9</i> en el qPCR	41

CAPITULO 3

TABLA 1. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de células dendríticas	71
TABLA 2. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de células T regulatorias	75

CAPITULO 4

TABLA 1. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de microarreglos de proteínas	87
TABLA 2. Ratios de los genes codantes de las proteínas de <i>P. falciparum</i> reconocidas diferencialmente (piN/piS*).	90

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1

- FIGURA 1.** Mapa de incidencia de malaria por distritos Perú 2014. (A) Casos de infecciones con *P. falciparum* y *P. vivax*. (B) Casos de infecciones con *P. falciparum*. 05
- FIGURA 2.** Casos de malaria por especie en Loreto entre el 2007 y 2014 05
- FIGURA 3.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. 08
- FIGURA 4.** Heterogeneidad de los reservorios asintomáticos en zonas de alta transmisión y zonas de baja transmisión. 11
- FIGURA 5.** Modelo Teórico de los Resultados Obtenidos en la estimulación *ex vivo* con antígenos de *P. falciparum* de los PBMCs de pacientes sintomáticos (S) (en fase aguda de la infección) e individuos asintomáticos (AS) provenientes de las comunidades de la Amazonía peruana 22
- FIGURA 6.** Modelo Teórico de los Resultados Obtenidos en la estimulación *in vivo* con antígenos de *P. falciparum* de los PBMCs de pacientes sintomáticos (S) (en fase aguda de la infección) e individuos asintomáticos (AS) provenientes de las comunidades de la Amazonía peruana 23
- FIGURA 7.** Comunidades cercanas a la ciudad de Iquitos donde se realizaron la DCP y la DCA 25

CAPITULO 2

- FIGURA 1.** PCR de la hemozoina (HZ) natural no tratada y tratada con ADNasa Turbo (HZTx) 35
- FIGURA 2.** Expresión relativa de los genes *tnf* (A) e *ifn*-(B) en PBMCs de pacientes S e individuos AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 por qPCR 46
- FIGURA 3.** Expresión relativa de los genes *il-10* (A) y *tgf-β* (B) en PBMCs de pacientes S e individuos AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 por qPCR 48
- FIGURA 4.** Expresión relativa del gen *tlr9* en PBMCs de pacientes S e

individuos AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1	49
FIGURA 5. Niveles de IFN- γ por estimulo (CpG, Hz, HzTx, MSP1) en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación	51
FIGURA 6. Niveles de IL-10 por estimulo (CpG, Hz, HzTx, MSP1) en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación	51
FIGURA 7. Niveles de TGF- β por estimulo (CpG, Hz, HzTx, MSP1) en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación	52
FIGURA 8. Niveles de IFN- γ en el sobrenadante de los PBMCs de pacientes S e individuos AS y C no estimulados (Nil) después de 16 h de incubación	53
FIGURA 9. Niveles de IL-10 en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación de pacientes S e individuos AS y C. (A) Nil, (B) Hz, (C) HzTx y (D) MSP1	55
FIGURA 10. Niveles de TGF- β en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación de pacientes S e individuos AS y C. (A) Nil, (B) Hz, (C) HzTx y (D) MSP1	57
FIGURA 11. Presencia de la subunidad p-65 de NF κ B en los PBMCs de individuos (A) AS y pacientes (B) S frente a los diferentes estimulos (Hz, HzTx, CpG y PHA)	58
CAPITULO #	
FIGURA 1. (A) Número absoluto de células dendríticas (CD) totales en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por <i>P. falciparum</i> (B) Número absoluto de CD mieloides (CDm) en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por <i>P. falciparum</i> . (C) Número absoluto de CD plasmocitoides (CDp) en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por <i>P. falciparum</i> .	72
FIGURA 2. Correlación de los números absolutos de las células dendríticas	

(CD) totales y la parasitemia en pacientes sintomáticos y
asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum* 73

CAPITULO 4

FIGURA 1. Antígenos de *P. falciparum* reactivos diferencialmente entre sujetos AS y S. El color rojo indica la intensidad de señal más alta. A la derecha, se muestran los valores transformados en varianza para los sujetos AS (barra azul) y sujetos S (barra roja), mostrando la intensidad de señal diferentes cuantitativamente. El “*heat map*” fue hecho utilizando el Multi-Experiment Viewer (MEV) 4.8 88

FIGURA 2. (A) Antígenos de *P. falciparum* altamente reactivos por el suero de asintomáticos (columnas en azul) y sintomáticos (columnas en rojo). (B) Proteínas candidatas para estudios seroepidemiológicos altamente reactivos en asintomáticos y sintomáticos. 89

ABREVIATURAS

ADN	:	Acido Desoxirribonucleico
ADNasas	:	Proteasas de ADN
ADNc	:	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	:	Acido Ribonucleico
ARNasas	:	Proteasas de ARN
dNTP	:	Desoxirribonucleósido trifosfato
g	:	Gravedades
qPCR	:	PCR en tiempo real
RT-PCR	:	Trascrición reversa PCR
Ab	:	Anticuerpo
ACTB	:	Beta-actina
Ag	:	Antígeno
CPA	:	Célula Presentadora de Antígeno
CpG	:	Oligonucleótido sintético
CDs	:	Células Dendríticas
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
Hb	:	Hemoglobina
HLA	:	Antígenos leucocitarios humanos
Hz	:	Hemozoína
HzTx	:	Hemozoína + Tratamiento ADNasa
IFN- γ	:	Interferón gamma
IgG	:	Inmunoglobulina G
IL	:	Interleuquina
iNOS	:	Óxido nítrico sintasa inducible
LAMP	:	Amplificación Isotérmica por horquilla
LPS	:	Lipopolisacarido
MHC	:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MSP	:	Proteína de Superficie de Merozoito
NIL	:	Control Negativo
NK	:	Natural Killer
NO	:	Óxido nítrico sintasa

PAMP	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	:	Célula mononuclear de sangre periférica
PHA	:	Fitohemaglutinina
qPCR	:	Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativo
RPMI 1640	:	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
TGF- β	:	Factor de crecimiento transformante beta
Th	:	Células T Helper
TLR	:	Receptores tipo Toll
TNF α	:	Factor de necrosis tumoral alfa
Tregs	:	Células T Regulatorias
β -2M	:	Beta-2-microglobulina

RESUMEN

La malaria o paludismo es una de las enfermedades parasitarias más importantes del mundo y la Amazonía peruana es considerada como un área de baja transmisión de esta enfermedad. Como consecuencia de ello, es fácil encontrar un gran número de infecciones febriles y no febriles, estos últimos dan una idea de la población de individuos asintomáticos por *P. falciparum*. Hay evidencia de que los individuos infectados con *P. falciparum* pueden tener un amplio espectro de manifestaciones clínicas, y esto se determina, en parte, por el equilibrio de las respuestas inmunitarias pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Incapacidad para desarrollar una respuesta pro-inflamatoria efectiva puede conducir a la replicación del parásito sin restricciones, mientras que la falla o insuficiencia para regular esta respuesta conduce al desarrollo de inmunopatología grave. En el presente estudio, se observó que la expresión relativa del gen de *il-10* y la proteína de IL-10 en el sobrenadante de los PBMCs estimulados *ex vivo* con hemozoina tratada con ADNasas (HzTx) fue la más elevada en sujetos AS y C; con lo que podríamos deducir que los complejos protéicos (no investigados en este trabajo) adheridos a la Hz libre de ADN (HzTx) podrían ser los responsables de la elevada respuesta inmune generada por este antígeno. Asimismo, observamos que las células T regulatorias no ejercen ningún control aparente durante la infección por malaria, y que la infección con *P. falciparum* indujo una significativa disminución en los números absolutos de CD4. Además, los sujetos AS infectados con *P. falciparum* mostraron una respuesta de anticuerpos IgG alta y diferencial comparado a los sujetos S, concluyendo que la respuesta celular estaría inclinada hacia la inmunoregulación dominada por IL-10, más no así por células T regulatorias en individuos asintomáticos, que estaría suprimiendo la respuesta inflamatoria generada por IFN- γ . Por lo tanto, en asintomáticos con infección por *P. falciparum*, la inmunoregulación de IL-10 sería suficiente para contener al parásito pero al mismo tiempo estaría evitando el daño al hospedero por inflamación. Finalmente, la eliminación del parásito se generaría con la respuesta de anticuerpos a través de las células B.

Palabras claves: *P. falciparum*, Asintomáticos, Respuesta Inmune

SUMMARY

Malaria is one of the most important parasitic diseases in the world and the Peruvian Amazon is considered as a low transmission area for this disease. As consequence, is easy to find a high number of febriles and non-febrile infections, these last ones give an idea of the population of *P. falciparum* asymptomatic individuals. There is evidence that *P. falciparum* infected individuals may have a wide spectrum of clinical manifestations, and this is determined, in part, by the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory immune responses. Failure to develop an effective pro-inflammatory response can lead to unrestricted parasite replication, while failure to regulate this response leads to the development of severe immunopathology. In the present study, the relative expression of the *il-10* gene and the IL-10 protein in the supernatant of PBMCs stimulated *ex vivo* with hemozoin treated with DNases (HzTx) were the highest in AS and C subjects; which could be deduced that the protein complexes (not investigated in this work) adhered to the free DNA Hz (HzTx) could be responsible for the high immune response generated by this antigen. We also observed that regulatory T cells did not exert any apparent control during malaria infection and that infection with *P. falciparum* induced a significant decrease in absolute CD numbers. In addition, *P. falciparum* infected AS subjects showed a high and differential IgG antibody response compared to S subjects, concluding that the cellular response would be inclined toward immunoregulation IL-10-dominated, but not by regulatory T cells in individuals AS, which would be suppressing the inflammatory response generated by IFN- γ . Therefore, in asymptomatic patients with *P. falciparum* infection, immunoregulation by IL-10 would be sufficient to contain the parasite but at the same time it would avoid damage to the host by inflammation. Finally, the elimination of the parasite would be generated with the antibody response through the B cells.

Keywords: *P. falciparum*, Asymptomatic, Immune Response

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades:

Malaria o paludismo pertenece al grupo de enfermedades infecciosas re-emergentes y es causada por el parásito unicelular del género *Plasmodium*, el cual es transmitido por el mosquito hembra del género *Anopheles sp.* En el hospedero, las formas sanguíneas asexuales del parásito son las responsables por la morbilidad y mortalidad a causa de esta infección. Actualmente se sabe que cinco especies del parásito son las causantes de la enfermedad en el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, siendo cuatro de estas especies las que dan lugar a una considerable tasa de morbilidad y sólo *P. falciparum* reporta una alta tasa de mortalidad como resultado de su prevalencia, virulencia y resistencia a drogas entre otros factores.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 3.2 billones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad, lo que resulta en 198 millones de casos aproximadamente y alrededor de 584,000 muertes cada año; siendo los habitantes de los países tropicales más pobres los más vulnerables a presentar la infección. Por otro lado, gracias al aumento de las medidas de control y prevención de la malaria, la carga de la enfermedad se está reduciendo notablemente en muchos lugares. Desde el año 2000, las tasas de mortalidad han decaído en más de un 47% en todo el mundo y un 54% en la región de África [1].

Por otro lado y no menos importante, la malaria fija una barrera para el crecimiento económico nacional y constituye una amenaza constante para la salud, el bienestar y la estabilidad económica de millones de personas en el mundo.

I.2. Malaria en el Perú

La malaria es un importante problema de Salud Pública en el Perú, el cual es considerado como una región hipoendémica para malaria, donde se ha tratado de erradicarla desde los años 40. En los años 50's durante los inicios del Programa

Nacional de Erradicación de la Malaria, las zonas endémicas de malaria alcanzaba el 75% del territorio nacional (961,200 Km²), incluyendo toda la selva alta y selva baja, los valles de la costa hasta los 2,000 msnm y los valles interandinos por debajo de los 2,300 msnm. En 1968, el área endémica se redujo en un 86% y la población en riesgo de adquirir la enfermedad disminuyó en un 97% quedando pocas áreas con malaria persistente (180,000 Km²) [2]. De esta manera, se mantuvo un control sostenible durante la década de 1980. A inicios de los 90s, se incrementó la incidencia en las regiones de mayor endemividad del país, la Amazonía y la Costa Norte y este hecho estuvo asociado con la dispersión e intensificación de la resistencia de cepas de *P. falciparum* a la cloroquina (CQ) y sulfadoxina-pirimetamina (SP), tratamientos de primera línea en ese entonces. En la Cuenca Amazónica, el incremento se asoció probablemente también con la reintroducción del vector *Anopheles darlingi* en esta zona del país. Más alarmante fue el incremento de casos de *P. falciparum*, que se elevaron de 125 casos en 1991 a más de 30,000 casos en 1996.

Asimismo, el incremento de casos se agudizó a finales de esta década debido al Fenómeno del Niño del año 1998. En la Costa Norte, el número total de casos de malaria se incrementó de 15,000 en 1997 a 101,000 en 1998, descendiendo a 65,000 casos en 1999; en este contexto, los casos de *P. falciparum* se elevaron rápidamente de 6,000 en 1997 a 51,000 en 1998 [3].

A partir del año 2006, el número de casos de *P. falciparum* y *P. vivax* disminuyeron considerablemente en la Cuenca Amazónica debido a la implementación de estrategias de control organizadas por el proyecto “Control de Malaria en zonas de frontera (PAMAFRO), financiado por el Fondo Global a través del Organismo Andino de la Salud, Convenio Hipólito Unanue. Este proyecto involucró a 4 países de la región (Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela), y entre las estrategias de control implementadas tenemos: distribución de mosquiteros y pruebas de diagnóstico rápido, entrenamiento de microscopistas, nuevos puestos de diagnóstico por microscopía, trabajo comunitario y con promotores de salud. Al finalizar este proyecto en el año 2010, el número de casos reportados fue de aproximadamente 10,000 en la región Amazónica.

Si bien durante los últimos 5 años, el número de casos de *P. falciparum* y *P. vivax* en la Cuenca Amazónica ha disminuido en cierto modo; sin embargo las condiciones climáticas y ambientales favorables, asociadas a la presencia de un vector, aseguran que la malaria continuará siendo un problema de salud pública en esta región del país [2,3]. Sumado a la falta de continuidad de las medidas de control implementadas por el proyecto PAMAFRO.

Actualmente, según el último boletín de malaria del 2015 proporcionado por la Dirección General de Epidemiología (DGE) del Ministerio de la Salud (MINS), el Perú presenta zonas de mediano y bajo riesgo de malaria. En el 2014, el Perú presentó 64,716 casos de la enfermedad, de los cuales 54,426 fueron por *P. vivax* y 10,290 por *P. falciparum*. De la totalidad de casos reportados, 60,566 pertenecen al departamento de Loreto. El clima tropical, lluvioso, húmedo y cálido de esta zona permite la reproducción y formación de criaderos del vector, lo cual desencadena la transmisión de malaria. Otros departamentos del país que reportaron casos de malaria en el 2014 fueron Piura (10), Junín (2,051), San Martín (763), Madre de Dios (11), Ayacucho (681), Cuzco (362), Tumbes (1), Ucayali (60), La Libertad (47), Cajamarca (1), Amazonas (108), Lambayeque (5), Pasco (9) e Ica (1) [4] (Figuras 1 y 2).

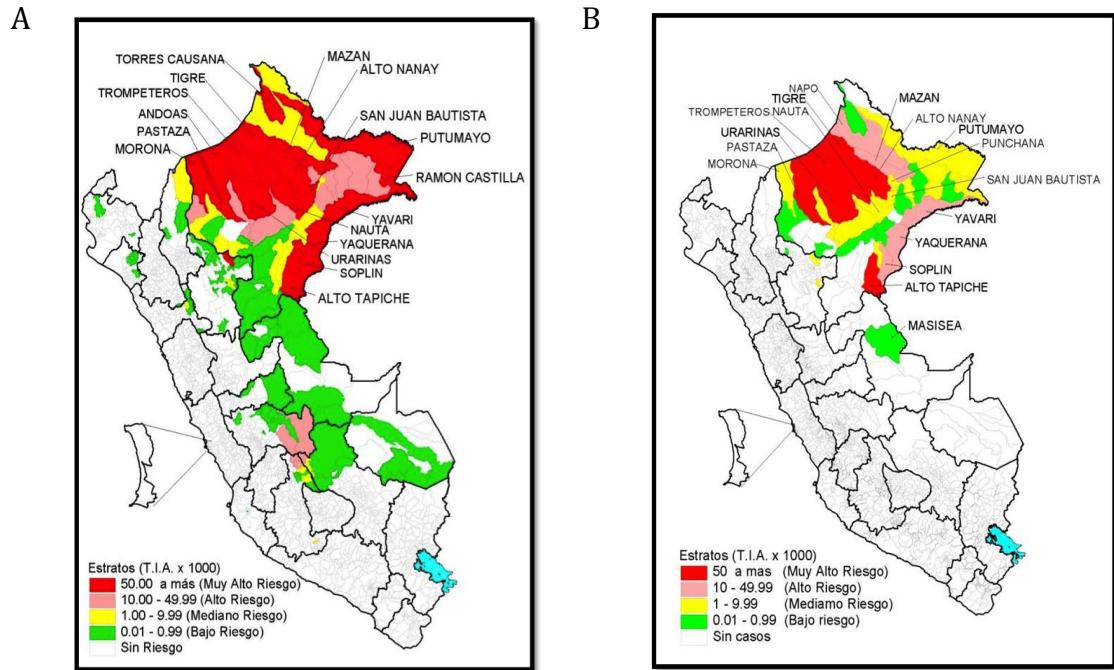


FIGURA 1. Mapa de incidencia de malaria por distritos Perú 2014. (A) Casos de infecciones con *P. falciparum* y *P. vivax*. (B) Casos de infecciones con *P. falciparum*. [FUENTE: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA (*) Hasta la Semana (SE) 53 del 2014]

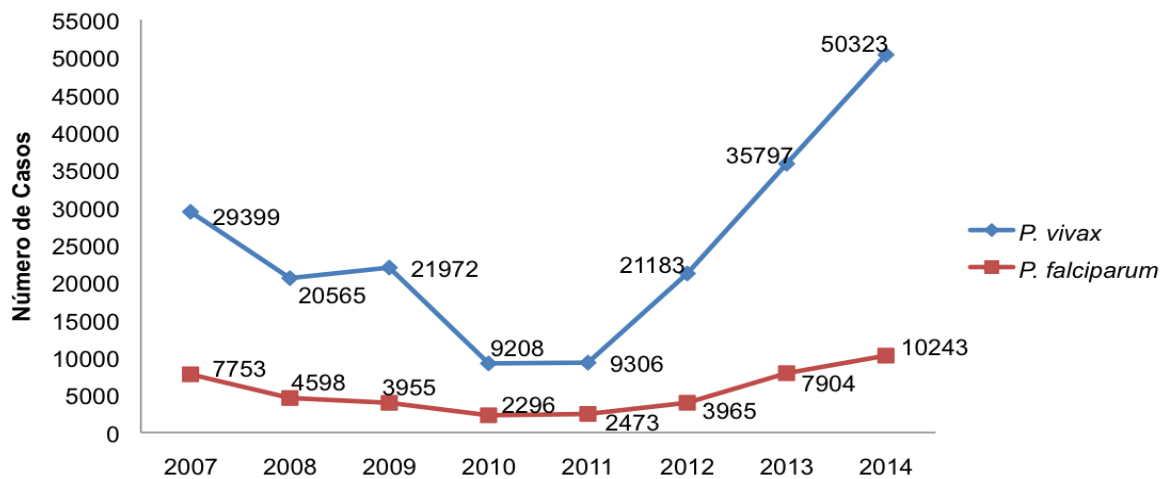


FIGURA 2. Casos de malaria por especie en Loreto entre el 2007 y 2014. [Fuente: Dirección General de Epidemiología (DGE) del Ministerio de la Salud (MINSA). Boletín Epidemiológico de Malaria. 2012, 2013 y 2014].

El Perú es considerado una zona de baja transmisión a malaria, sin embargo, no se deben descuidar las medidas de prevención y control, especialmente en las zonas de mayor prevalencia. Como ya se mencionó anteriormente, *P. falciparum* es la especie que causa mayores daños en las personas que adquieren el parásito, por eso es una de las más estudiadas en el mundo. Cada vez más científicos indagan sobre esta especie y buscan en diferentes técnicas celulares, moleculares e inmunológicas su mecanismo de invasión, las mutaciones y características que presenta su genoma, así como la activación del sistema inmune para contrarrestar los efectos que desencadena en el hospedero humano; con el fin de recolectar información que les brinde un mejor entendimiento de la infección y permita el desarrollo de la vacuna. Todo esto debe ir de la mano con la implementación de diversos métodos de control para ayudar a su erradicación. Tal es el caso del uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración para evitar picaduras y por ende la entrada de los estadíos infectivos al hombre [4], asimismo, la implementación del diagnóstico rápido y tratamiento oportuno.

I.3. Ciclo de vida de *Plasmodium sp.*

El ciclo de vida del parásito *Plasmodium* (Figura 3) causante de la malaria se divide en tres fases: La fase exo-eritrocitaria que se da en el hígado y se inicia cuando la hembra del mosquito *Anopheles* infectada con *Plasmodium* inocula esporozoitos al momento de la picadura. Los esporozoitos que representan el estadio infectivo, tardan entre 15 a 30 minutos para llegar al hígado e invadir los hepatocitos, dando inicio a un ciclo de reproducción asexual. En las células del hígado, los esporozoitos se diferencian a esquizontes en un lapso de 6-13 días, estos esquizontes contienen a los merozoitos uninucleados haploides que se lisan para liberar los merozoitos maduros. Estos pueden seguir invadiendo más células del hígado o dirigirse al torrente sanguíneo para infectar eritrocitos. Algunas especies de malaria como *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*, presentan un estadio del parásito llamado hipnozoito, el cual se mantiene en estado latente por semanas, meses o años en el hígado causando episodios recurrentes.

La fase eritrocitaria se inicia con la invasión de los eritrocitos por los merozoitos, después del cual se da la reproducción asexual, y la liberación de nuevos merozoitos

formados en los eritrocitos repetidamente cada 1 a 3 días. Una vez que el merozoito ingresa al eritrocito se diferencia como una célula uninucleada denominada trofozoito inmaduro el cual tiene la forma de anillo. Posteriormente el núcleo del trofozoito se divide asexualmente para producir un esquizonte el cual contiene entre 8 a 16 merozoitos mononucleados. Debido al deterioro del eritrocito por la reproducción del parásito en su interior, este se lisa y libera las toxinas en el torrente sanguíneo del hospedero permitiendo la acción de la respuesta inmunológica, trayendo consigo el ciclo de fiebre y escalofríos característico de esta enfermedad. Por otro lado, existen eritrocitos infectados con merozoitos en el que no se da el ciclo de multiplicación asexual, sino se desarrollan en gametocitos masculino y femenino, formas sexuales del parásito, los que serán ingeridos por el mosquito en una próxima picadura para dar inicio a la fase esporogónica.

Esta última fase se lleva a cabo en el intestino del mosquito, en donde los eritrocitos infectados se lisan liberando a los gametocitos los cuales maduran en gametos masculino y femenino para que se dé la fertilización. Como resultado de dicho proceso se forma un cigoto diploide, que se desarrolla en un ooquinetto motil. Este estadio del parásito penetra las paredes del intestino y se convierte en un ooquiste. El crecimiento y división de cada ooquiste produce miles de formas haploides activas llamadas esporozoitos. Después de 8 a 15 días, el ooquiste libera a los esporozoitos en la cavidad corporal del mosquito, desde donde se trasladan e invaden a las glándulas salivales. El ciclo de la infección en el hombre se reinicia cuando el mosquito pica a otro humano, inoculando al mismo tiempo los esporozoitos en el torrente sanguíneo [5].

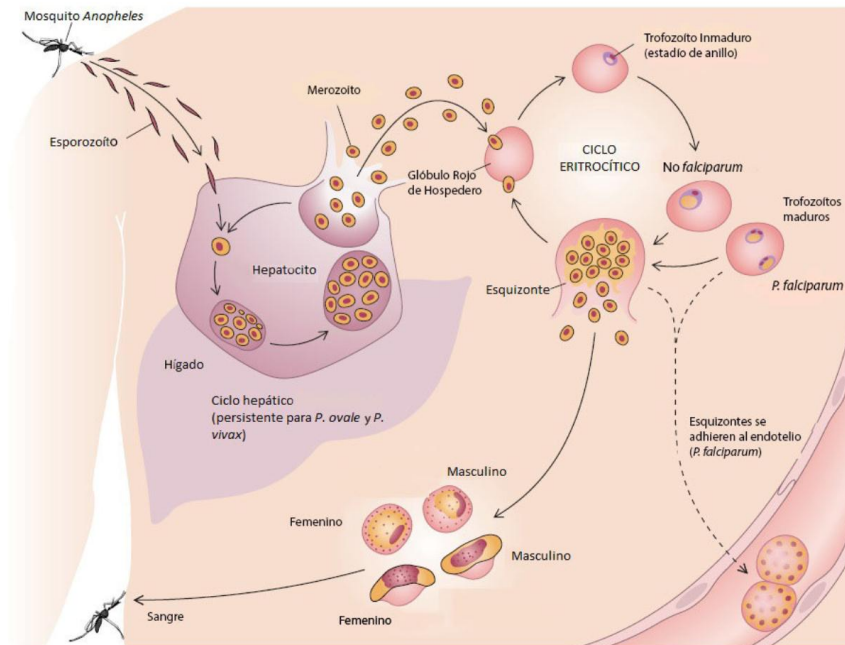


FIGURA 3. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. [Referencia: <http://www.medicinanet.com.br/imagens/20140526103034.jpg>]

Las cinco especies que infectan a los humanos se caracterizan por completar una generación, dentro del eritrocito, en un tiempo establecido. Por ejemplo, *P. knowlesi*, el parásito zoonótico emergente, sólo toma 24 horas en completar su generación, *P. falciparum* tarda 36 horas debido a su rápida tasa de reproducción y corto periodo de incubación, *P. vivax* y *P. ovale* demoran 48 horas, mientras que *P. malariae* requiere 72 horas. Este último produce el mayor número de merozoitos por generación, comparado con otras especies [6]. Por otro lado, se ha reportado que *P. falciparum* puede ocupar hasta el 60% de los eritrocitos del hospedero, otras especies generalmente ocupan menos del 2% y *P. vivax* infecta principalmente a los reticulocitos [7].

I.4. Taxonomía

La malaria es causada por un protozoo unicelular del género *Plasmodium*. Este género es parte de un Filo de organismos protistas unicelulares llamados Apicomplexa.

Los Apicomplexa poseen en su mayoría un órgano llamado apicoplasto, que es parte de una estructura apical diseñada para ayudar al ingreso de la célula huésped. El Apicomplexa se divide en dos clases, de las cuales *Plasmodium* pertenece a la Aconoidasida (carentes de una estructura llamada conoide y se distingue como un conjunto de microtúbulos), y luego a la Orden *Haemosporidia*, que contiene los

parásitos que invaden los glóbulos rojos. Dentro de este Orden, *Plasmodium* pertenece a la familia *Plasmodiidae*, donde todos comparten numerosas características, incluyendo la reproducción asexual en un huésped vertebrado y la reproducción sexual en un huésped definitivo (un mosquito, en el caso de las especies de *Plasmodium* que infectan a todos los mamíferos, incluidos los seres humanos).

En la Malaria humana, el huésped definitivo se refiere a menudo al vector. La familia contiene unos doce géneros, siendo uno de ellos *Plasmodium*, que a su vez se encuentra dividida en numerosos sub-géneros, y luego otra vez en cientos de diferentes especies, de las cuales cinco infectan a los humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*).

Clasificación de *Plasmodium falciparum* (Sistema Nature, Linneo 1758)

- Reino: Protista
- Subreino: Protozoa
- Filo: Apicomplexa
- Clase: Sporozoa
- Orden: Eucoccidia
- Suborden: Haemosporidae
- Familia: Plasmodiidae
- Género: Plasmodium
- Especie: *P. falciparum*

I.5 Malaria Asintomática

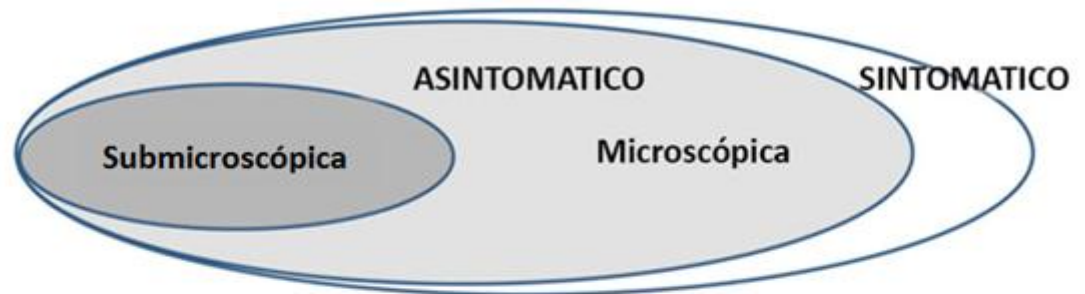
La definición de malaria asintomática no está bien establecida, ya que no existe un criterio de diagnóstico definitivo que defina este estatus. Entre de los criterios más utilizados tenemos la presencia de parásitos en frotis y gota gruesa de sangre periférica, la temperatura axilar <37,5 °C y la ausencia de síntomas relacionados a esta enfermedad. Se ha reportado también, que en la mayoría de las zonas de transmisión endémica a la malaria, las infecciones asintomáticas superan en número a las infecciones sintomáticas [8-10]. Con esto, se deduce que el éxito de las

estrategias de control y eliminación de la malaria se basaría en la capacidad de encontrar y tratar los casos asintomáticos.

En los individuos asintomáticos los parásitos pueden ser detectados por microscopía (gota gruesa o frotis) o sólo por métodos moleculares sensibles, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el método de Amplificación Isotérmica por Horquilla (LAMP), los que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito. Con estas dos últimas técnicas de diagnóstico se ha sacado a la luz la alta prevalencia de casos asintomáticos en las regiones endémicas con malaria submicroscópica o subpatente (parásitos que no pueden ser detectados por microscopía debido a la baja parasitemia). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la capacidad de los asintomáticos de llevar los parásitos sin presentar ningún síntoma se han llevado a cabo en casos microscópicos o patentes (parásitos que pueden ser detectados por microscopía). Por consiguiente, el rol de la malaria submicroscópica en la transmisión en zonas endémicas no está claro [11].

Se han establecido dos características fundamentales en la malaria asintomática: la duración de la infección y la densidad de gametocitos. Las infecciones que persisten por largos períodos de tiempo significan más oportunidades para que una persona con malaria pueda infectar mosquitos y de esta manera el ciclo de transmisión continúe, debido a que los gametocitos de *P. falciparum* tienden a aparecer tardíamente, alrededor de 7 a 15 días después de la primera aparición de los parásitos en la sangre [12]. Se ha observado entre las personas con malaria asintomática provenientes de zonas de moderada a alta transmisión en África, que las infecciones con densidades más altas de gametocitos son generalmente más infecciosas. Sin embargo, las densidades de gametocitos de los individuos asintomáticos de zonas de baja transmisión son más heterogéneas y no necesariamente comparten las mismas características de lo que ocurre en zonas alta transmisión (Figura 4) [11].

A. Zona de alta transmisión



B. Zona de baja transmisión

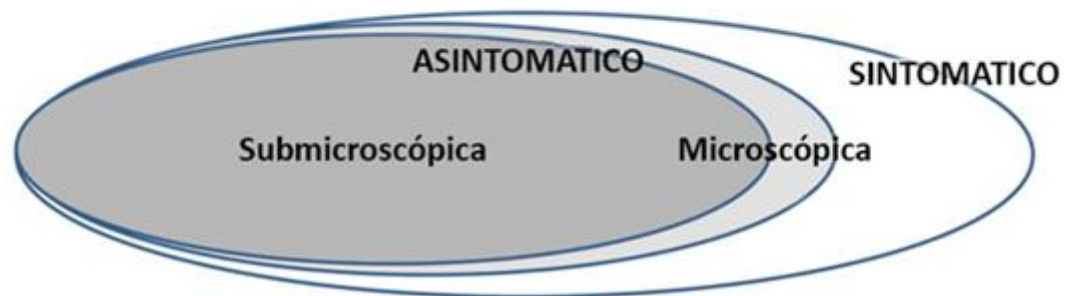


FIGURA 4. Heterogeneidad de los reservorios asintomáticos en zonas de alta transmisión y zonas de baja transmisión. [Figura tomada de la referencia: Lin J. et. al. *Trends in Parasitology*. 2014;30(4):183-190]

Es común que en zonas de moderada a alta transmisión como África, los individuos asintomáticos con infecciones patentes contengan al parásito de semanas a meses [13,14]. Este fenómeno ha sido explicado por la inmunidad adquirida que mantiene la parasitemia y síntomas bajo control sin lograr la completa eliminación del *Plasmodium* [15].

La situación en las zonas baja transmisión (no africanos) como la Amazonía y el Sudeste Asiático es mucho más complicado. En primer lugar, debido a que la mayoría de las infecciones asintomáticas de malaria son submicroscópicas [8, 9, 16]. En segundo lugar, *P. vivax* es la especie de mayor prevalencia de malaria a menudo acompañada por *P. falciparum*.

Asimismo, se espera que con niveles más bajos de transmisión la inmunidad adquirida sea menor. Es decir, con el paso del tiempo y la continua exposición se

incrementarían las probabilidades de ser asintomático, ya que el individuo estaría en proceso de adquisición de la inmunidad clínica y por ende la eliminación de la parasitemia o podría estar en el proceso de desarrollar una infección sintomática [8, 17, 18].

Mucho menos se sabe sobre los reservorios de gametocitos entre las infecciones asintomáticas en entornos de baja transmisión. Un estudio realizado en nuestro país basado en microscopía positiva para malaria, encontró que un impresionante 50% de infecciones por *P. falciparum* y un 22% por *P. vivax* albergaba gametocitos identificados a través de la detección activa de casos [19].

En este contexto, el estudio de la respuesta inmune en malaria, específicamente los mecanismos inmunológicos que conducen a la malaria asintomática por *P. falciparum* y *P. vivax* en la región Amazónica Peruana podría dilucidar importantes aspectos de este estatus o condición.

I.6. Respuesta Inmune en Malaria

I.6.1 Respuesta Inmune Innata

La respuesta inmune innata se desencadena al inicio de la infección para restringir la máxima densidad de parásitos. Las células encargadas de esta respuesta son las células dendríticas (CDs), monocitos/macrófagos, células *natural killer* (NK) y *natural killer* citotóxicas (NKT).

Las CDs reconocen patrones moleculares relativamente conservados entre varios organismos patogénicos a través de un rango de receptores denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Entre los más representativos están los receptores tipo Toll (TLR). A partir del reconocimiento de los PAMPs, los TLRs inducen una señal de cascada que conduce a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas e interferones [20], generando la maduración de las CDs. Éstas, están especializadas en capturar, procesar y presentar antígenos de *Plasmodium* a las células T efectoras (células T CD4⁺) para su activación a través del complejo de histocompatibilidad II (MHC II), el receptor de células T (TCR), interferon- γ (IFN- γ), interleuquina-12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral- α

(TNF- α). La activación de las células T conduce a su vez a la activación de los macrófagos, la fagocitosis de los glóbulos rojos infectados, activación de las células NK, la producción de citoquinas y pequeñas moléculas inflamatorias tales como el óxido nítrico (NO) y radicales de O₂ [21].

Después de la respuesta primaria, algunos linfocitos se convierten en células de memoria, los cuales se reactivarán rápidamente durante una infección subsecuente.

Las CD_s están divididas en dos diferentes sub-tipos celulares basados en sus funciones biológicas: CD_s plasmacitoides (CD_p) y CD_s mieloides (CD_m). Estas últimas son las responsables de presentar los antígenos a las células T efectoras. En contraste, las CD_p están consideradas como células de la modulación inmune a través de la secreción de grandes cantidades de IFN- γ [22].

Durante la fase exo-eritrocítica que se desarrolla en el hígado, los esporozoitos y/o los hepatocitos parasitados activan directamente las células de la respuesta inmune innata. Las CD_s, monocitos y macrófagos se encargan de fagocitar al hepatocito parasitado, al material liberado del parásito por una desintegración del hepatocito parasitado y a los merozoitos liberados por el esquizonte maduro formado dentro del hepatocito. Todo ello con el fin de procesar antígenos para presentárselos a las células T (principalmente T CD8⁺) que producen IFN- γ , entre otras citoquinas, y para inducir clonas de células T. Debido al reconocimiento del parásito las CD_s, monocitos y macrófagos secretan una serie de citoquinas que activan a las células NK en la producción y liberación de IFN- γ , el cual permite la activación de óxido nítrico sintasa (iNOS) para producir óxido nítrico (NO) en hepatocitos infectados, macrófagos y células NK que se encargan de eliminar al parásito por su efecto tóxico [23]. Adicionalmente se sabe que las células NK identifican moléculas codificadas por el patógeno a través de un grupo de receptores activadores o inhibidores [24]. De este modo, las células NK inician la lisis celular mediada por perforinas y granzimas. Las NK son las de menor cantidad dentro del grupo celular de respuesta inmune innata y su activación se debe a la unión entre su receptor con el glicolípido α -GalCer, mostrado por las células presentadoras de antígeno (CPA), lo cual desencadena la producción de IFN- γ que permite la eliminación de hepatocitos parasitados [25].

En la fase eritrocítica, la cual se desarrolla en el torrente sanguíneo con la invasión de los eritrocitos, las CDs tienen la misma función descrita anteriormente. Las células NK son las primeras en iniciar la respuesta de ataque ante una infección con *Plasmodium* debido al incremento en su población, la producción de IFN- γ y NO, y la habilidad de lisar eritrocitos parasitados. Por lo tanto, para estimular su activación y la de sus mecanismos inmunes se requiere la producción y secreción de IL-12 e IL-18, por monocitos, macrófagos y CDs, así como un contacto directo entre este tipo celular con los eritrocitos parasitados a quienes reconoce por medio de receptores específicos para luego desencadenar la lisis de eritrocitos parasitados por la secreción de perforinas y granzimas [26]. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos inmunes de las células NK es la producción de IFN- γ que aparte de ser la citoquina clave de la respuesta inflamatoria, también permite la activación de monocitos, macrófagos y CD que contribuyen a la eliminación del parásito a través de la presentación de antígenos que estimulan a las células T. Por otro lado, las células NKT son un grupo celular que comparte propiedades con las células NK y las células T, estas serán activadas directamente por glicolípidos y fosfolípidos del parásito que le muestran las CPA, y por IL-12, lo cual conducirá a la producción de IFN- γ como una actividad protectora ante la infección [25].

En ambas fases descritas existe un subconjunto de células T, productoras de IFN- γ , llamado células T $\gamma\delta$ que están presentes durante la fase temprana de la infección por malaria y que por ende podrían contribuir con la respuesta innata. Asimismo, se ha visto que inhibe la replicación del parásito *in vitro* en células de donantes que nunca han sido expuestos a malaria [27].

Por lo tanto, la cinética de infección por malaria en humanos indica que la respuesta inmune innata es esencial para limitar la fase inicial de replicación del parásito, controlar la primera ola de parasitemia y dar tiempo al hospedero para desarrollar una respuesta adaptativa específica que permita eliminar la infección.

1.6.2 Respuesta Inmune Adaptativa

La respuesta inmune adaptativa surge aproximadamente 24 horas después de la infección y se activa por la respuesta inmune innata para una completa eliminación

del parásito [28]. Por lo tanto, los mecanismos adaptativos se llevarán a cabo por las células T, como T CD8⁺, T CD4⁺ “helper”, T regulatorias (Tregs), T de memoria; y por las células B efectoras y de memoria. Durante estos procesos las células de la respuesta inmune innata también estarán presentes ya que son necesarias para activar y diferenciar células T y B, mientras que estas permitirán su maduración, lo cual podría definirse como una retroalimentación positiva.

En la fase exo-eritrocitaria las células T CD8⁺ ganan mayor participación por su capacidad citotóxica, ya que median la protección previniendo el desarrollo del parásito en el hígado. Estas pueden matar parásitos en el hepatocito por una lisis mediada por perforinas y granzimas, inducir apoptosis y secretar citoquinas cuando reconocen antígenos por el MHC-I, especialmente IFN- γ que activa la producción de NO. Por otro lado, algunos estudios han señalado un rol de ayuda a las células B efectoras y T CD8⁺ por parte de las células T CD4⁺ en la invasión de parásitos a los hepatocitos. Durante la respuesta adaptativa las células T CD4⁺ se diferencian en algunos subconjuntos de células T “helper”, siendo las de mayor presencia las Th1 y Th2. Esto se da debido a la presencia o ausencia de citoquinas como IL-12, IFN- γ o IL-4, la naturaleza del patógeno, el tipo de antígeno, la ruta de administración o dosis de infección, la naturaleza o tipo de CPA y/o las señales coestimuladoras involucradas, y los factores genéticos del hospedero [29,30]. Las células Th1 participan regulando la inmunidad mediada por células, mientras que las Th2 regulan la inmunidad mediada por anticuerpos producidos por las células B efectoras. Dentro de esta fase, la inmunidad humoral o mediada por anticuerpos también tiene un rol importante, ya que se encarga de inhibir la invasión a los hepatocitos y de la opsonización de hepatocitos parasitados [31].

En la fase eritrocitaria, las CPAs se encargan de presentar los antígenos por medio del MHC II a las células T CD4⁺ de modo que estas inicien su diferenciación y posterior a eso, la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ante la infección con *Plasmodium*. Una vez dada la diferenciación de las células T CD4⁺, convencionalmente se sabe que las células Th1 se encargan de producir IFN- γ , ya que esta citoquina es un mediador crucial para la inmunidad del hospedero contra los patógenos intracelulares; mientras que las Th2 producirán IL-4, citoquina que media la inmunidad hacia los patógenos extracelulares y estimula la producción

de anticuerpos por células B. En esta fase existe una alta producción de IFN- γ como parte de una respuesta inmune conducida por células Th1, la cual está atribuida a la capacidad activadora de monocitos y macrófagos, con una rápida eliminación de los estadios eritrocíticos mediada por las especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno [30]. Es muy importante resaltar que la respuesta humoral o de anticuerpos por células B efectoras juega un rol sumamente importante en esta fase de invasión a los eritrocitos, ya que inhibe la invasión del merozoito al eritrocito y el crecimiento intraeritrocítico, así como aumenta la eliminación de eritrocitos parasitados de la circulación al unirse a su superficie, de este modo previenen el secuestro en los vasos sanguíneos y promueve su eliminación en el bazo. En particular, la opsonización de los eritrocitos parasitados incrementa significativamente su susceptibilidad a la fagocitosis, citotoxicidad e inhibición del parásito por varias células efectoras [31].

Sin embargo, se ha revelado que el paradigma Th1 y Th2 es mucho más complejo en malaria debido a que se han identificado nuevos subtipos de células T CD4⁺ como las células Tfh productoras principalmente de IL-21, las células Th17 que expresan el factor de transcripción ROR γ t, las células Th22 que secretan IL-22 y las células Tr1 productoras de IL-10; identificadas en modelos murinos y algunos en humanos aunque sin una definición muy clara, y que estarían involucradas en las diferentes vías de protección y regulación inmunológica de la enfermedad frente a *Plasmodium* [30].

Por otra parte, las células Tregs que fenotípicamente son células T CD4⁺CD25⁺ definidas por la expresión del factor de transcripción FOXP3, mantienen la homeostasis y pueden regular la respuesta inflamatoria dada por la respuesta inmune innata y la adaptativa durante la infección, tanto en la fase exo-eritrocítica como en la eritrocítica. No obstante, tienen una mayor participación durante la respuesta inmune adaptativa debido a la variedad de células presentes que liberan diferentes moléculas para eliminar al parásito. Las células Tregs median sus acciones a través de citoquinas inmunomoduladoras tales como IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estas células han demostrado suprimir la proliferación y producción de citoquinas pro-inflamatorias por células T CD4⁺ involucradas en la inmunidad protectora, así como la inmunopatología durante la malaria [33-34].

En resumen, es importante señalar que la respuesta adaptativa en humanos se presenta horas después de la infección por malaria, permitiendo una respuesta inmune mayor, que tiene como principal característica la participación de células T y B, que en conjunto con las demás células inmunes se encargan de una completa eliminación del parásito mediada por citoquinas y anticuerpos, respectivamente, asimismo generando células T y B de memoria importantes en el objetivo de la búsqueda de la vacuna.

1.6.3 Estudios Previos de Comparación de la Respuesta Inmune en Sintomáticos y Asintomáticos con Infección por *P. falciparum*

La adquisición de la inmunidad natural es gradual y requiere de una continua exposición a la infección por *Plasmodium* [35]. Esta inmunidad reduce el riesgo de la severidad de la enfermedad, pero no suprime la parasitemia. Una de las razones de esto, es la supresión de la respuesta de las células T efectoras [36]. Por lo tanto, se ha sugerido ampliamente que los mecanismos de defensa requieren la cooperación de la respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral a través de anticuerpos (Abs).

Los escasos reportes de la respuesta inmune en asintomáticos comparado con los casos sintomáticos en zonas endémicas con características similares de baja transmisión se han enfocado en los diferentes patrones de la respuesta humoral frente a *P. falciparum*. Por ejemplo, se observó una respuesta diferencial del perfil de Abs IgG (altos niveles de IgG1, IgG2 e IgG3) anti-*P. falciparum* en individuos asintomáticos y pacientes con malaria no complicada comparado con pacientes con malaria complicada no-cerebral quienes mostraron un perfil diferente (altos niveles de IgG4 e IgE) en zonas endémicas a malaria en Brasil [37].

Asimismo, en otra zona endémica de Brasil, se reportó que ciertos antígenos del merozoito como EBA-175, MSP5 y MSP9 generan una alta respuesta de Abs IgG y éstos son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del estatus asintomático, sugiriendo protección clínica a través de Abs en estos individuos [38].

Por otro lado, en zonas endémicas a *P. falciparum* en la Amazonía Peruana se ha encontrado que los individuos asintomáticos desarrollan inmunidad clínica

(asintomatología a malaria) mediada por los diferentes subtipos de anticuerpos IgG (IgG1 e IgG3) en respuesta a los antígenos relacionados a la invasión del parásito al eritrocito como las proteínas pertenecientes a las familias de Proteínas de Unión al Eritrocito (EBL) y Proteínas de Unión al Reticulocito (PfRh) [39].

En un estudio utilizando microarreglos de proteínas llevado a cabo en Tailandia, mostraron que los asintomáticos comparados con los sujetos sintomáticos presentaron altos niveles de Abs IgG anti-*P. falciparum* frente a determinados antígenos, entre ellos el MSP2, reconocido como un marcador relacionado a la protección en inmunidad clínica [40].

En zonas consideradas de alta transmisión como Mali, un estudio publicado recientemente reveló un aumento en la respuesta humoral relacionado a la protección clínica en malaria, principalmente en niños mayores de 6 años con una respuesta de Abs IgG elevada contra las proteínas AMA-1, MSP-3 y GLURP-R0 [41]. Por otro lado, en Gabon considerada también una zona de alta transmisión se reportó que niños con malaria asintomática presentaron una respuesta elevada en los niveles de IgG contra la proteína MSP3, además se observó niveles altos de IL-10 e IFN- γ en plasma sugiriendo que esta respuesta puede contribuir a la activación de los mecanismos inmune-protectivos que desencadenarían una infección asintomática por *P. falciparum* [42].

Respecto a la respuesta celular en asintomáticos se sabe muy poco, no obstante se ha reportado que infecciones asintomáticas asociados a *P. falciparum* resultaron en un incremento de la expresión del receptor tipo II de TNF (TNFR2), que es un marcador de activación de las células Tregs, así también la supresión de la respuesta Th2 [43].

Estos resultados nos indican que existe una significativa protección mediada por Abs en los asintomáticos, la cual es inducida a través de los años y una continua exposición a la infección natural con múltiples líneas de parásitos y antígenos, comparado con los casos sintomáticos.

I.7. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

El sistema inmune es el factor que determina si se producirán síntomas o no durante la infección por *Plasmodium*, controlando la parasitemia y la resistencia a la re-infección, pero de igual forma induciendo la patología asociada con la enfermedad. Las células T juegan un rol importante en estos eventos. Convencionalmente, se conoce que los dos brazos de la respuesta inmune celular están reguladas por los distintos subtipos de células T CD4⁺ “helper” denominadas Th1 y Th2 los que secretan diferentes patrones de citoquinas. Estos distintos perfiles de citoquinas producidas por las células Th1 responsables de las reacciones inflamatorias dictaminan su función efectora y, a su vez, las células Th2 como contraparte genera la inhibición de las funciones efectoras y la expansión clonal de las células B e inducen la respuesta IgM hacia la respuesta IgG.

Actualmente, se ha mostrado que el paradigma Th1/Th2 es mucho más complejo, ya que a través del tiempo se han identificado nuevos subtipos de células T CD4⁺, todos ellos descritos en modelos murinos y algunos en humanos aunque sin una definición clara. La diferenciación de estos subtipos de células se llevaría a cabo principalmente por las señales de las CDs durante la activación de las células T CD4⁺. Con esto, la regulación de la respuesta inflamatoria no estaría dada solo por un subtipo de células T CD4⁺ determinado, como las Th2, sino que IL-10 podría ser el mecanismo que regula los diferentes subtipos durante la infección con *Plasmodium* [32]. Asimismo, las fuertes controversias entre los antígenos Hz y la Hz libre de ADN de *P. falciparum* en el tipo de respuesta inmune innata/adaptativa que desencadenan en las células de pacientes con malaria es un tema importante de estudio.

Por otro lado, el efecto protector mediado por Abs IgG en respuesta a las diferentes proteínas del parásito reportada en individuos asintomáticos, nos indica que la inmunidad naturalmente adquirida se encuentra activa en estos individuos ayudando a controlar la parasitemia.

Un aspecto importante en este estudio es la asintomatología frente a la infección, que es un problema importante en el Perú, no solo por la continua transmisión de la

enfermedad [19]; sino también porque se ha convertido en un tema crítico en términos de la asignación del tratamiento, ya que, de acuerdo con las directrices nacionales de malaria en el Perú, solo la presencia del parásito en el frotis o gota gruesa de sangre es obligatoria para proporcionar tratamiento al paciente; con esto, los casos asintomáticos submicroscópicos quedarían fuera del esquema. Asimismo, esta condición en zonas endémicas del Perú, también representa una barrera crítica para la eliminación o erradicación de la malaria por lo que es crucial seguir diseñando nuevas estrategias de prevención, control y, más importante aún, el conocer los mecanismos inmunológicos que involucran la resistencia a la enfermedad llevando el parásito, en la mayoría de casos, en niveles bajos no detectables por microscopía y compararlos con los casos sintomáticos.

1.8. OBJETIVOS DE ESTA TESIS

El objetivo general de esta tesis fue explorar la respuesta inmunológica celular y humoral de individuos sintomáticos y asintomáticos con infección por *P. falciparum* provenientes de la Amazonía peruana en dos sistemas de evaluación *ex vivo* e *in vivo*.

El objetivo del primer capítulo experimental (capítulo 2) en este estudio, fue evaluar el perfil de citoquinas en las células mononucleares de pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum* estimulados con antígenos del parásito: Hemozoina (Hz), hemozoina tratada con ADNAsas (HzTx) y la proteína recombinante de superficie del merozoito (MSP1_{42kDa}), así también, con LPS y CpG ligandos de los receptores TLR4 y TLR9, respectivamente, utilizados como controles de estimulación. Esta aproximación es única porque evaluamos la expresión y secreción de citoquinas en estos dos grupos de pacientes para determinar si hay una o más citoquinas que son inducidas de manera específica en respuesta a los antígenos de *P. falciparum* y si fueron comparables entre ambos grupos de estudio. Los resultados obtenidos de este capítulo fueron traducidos en un modelo teórico (Figura 5).

El capítulo 3, tuvo como objetivo fenotipificar y cuantificar las células dendríticas (CD11c + CD123) y células T regulatorias (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺

CD127^{low}) en los PBMCs de pacientes sintomáticos e individuos asintomáticos con infección por *P. falciparum* con la finalidad de evaluar el número de células que activan de las células efectoras a través de la presentación de antígenos y las que regulan las funciones efectoras durante la infección aguda. La hipótesis planteada y confirmada fue que las células dendríticas de los pacientes sintomáticos disminuye considerablemente durante la infección debido a los niveles de parasitemia que presentan estos pacientes, asimismo, no se observó expansión celular de las células T regulatorias que controlarían la respuesta inflamatoria en sintomáticos.

Finalmente, el capítulo 4 nos muestra alcances contundentes en la comparación de la respuesta de anticuerpos IgG, en sintomáticos *versus* asintomáticos, frente a un panel de proteínas recombinantes del estadio asexual de *P. falciparum* utilizando microarreglos de proteínas. La hipótesis planteada fue que un perfil de anticuerpos específicos característicos en un grupo u otro podría predecir la falta de síntomas y por ende el estatus de inmunidad clínica. Los resultados confirmaron la reactividad de ciertas proteínas conocidas ampliamente como candidatos a vacuna (MSP1, EBA175) y nuevas proteínas que tendrían gran relevancia en la diferenciación de sintomáticos y asintomáticos en esta región hipoendémica.

Los capítulos 3 y 4 fueron traducidos en modelos teóricos de los resultados obtenidos en esta tesis en el modelo *in vivo*, con la finalidad de cerrar vacíos de los parámetros que no se midieron (Figura 6).

Ex vivo

Sintomático (S)

Asintomático (AS)

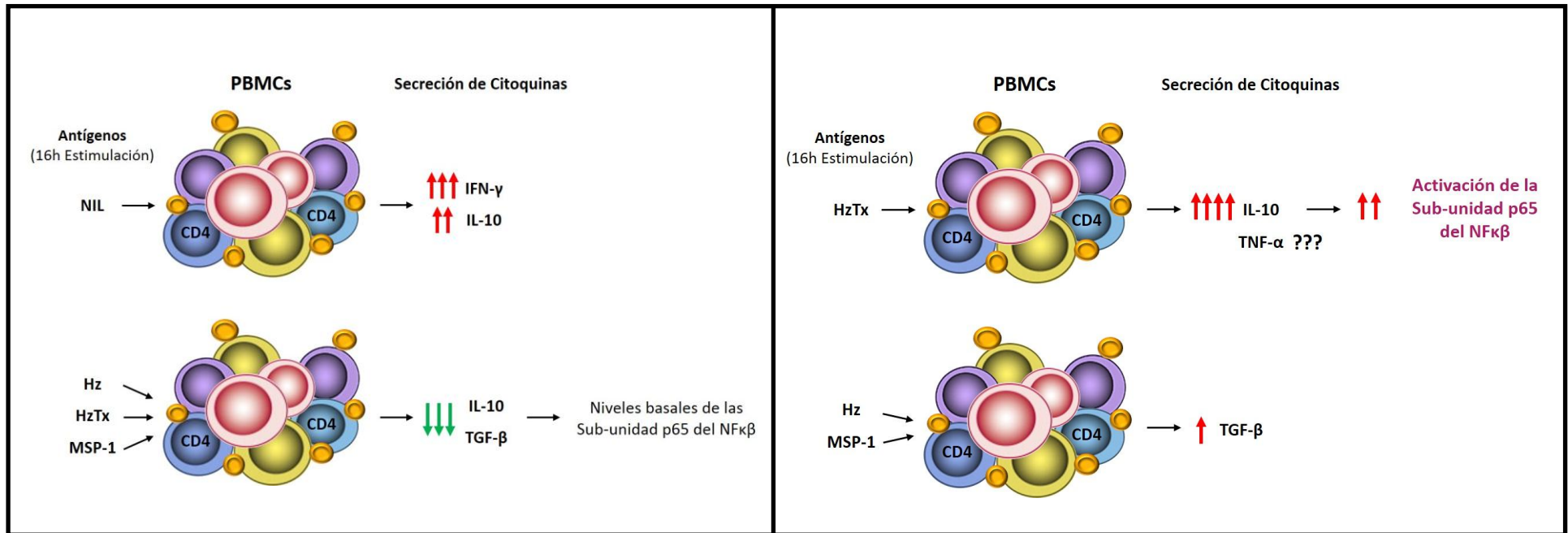


FIGURA 5. Modelo teórico de los resultados obtenidos en la estimulación *ex vivo* con antígenos de *P. falciparum* de los PBMCs de pacientes sintomáticos (S) (en fase aguda de la infección) e individuos asintomáticos (AS) provenientes de comunidades de la Amazonía peruana.

In vivo

Sintomático (S)

Asintomático (AS)

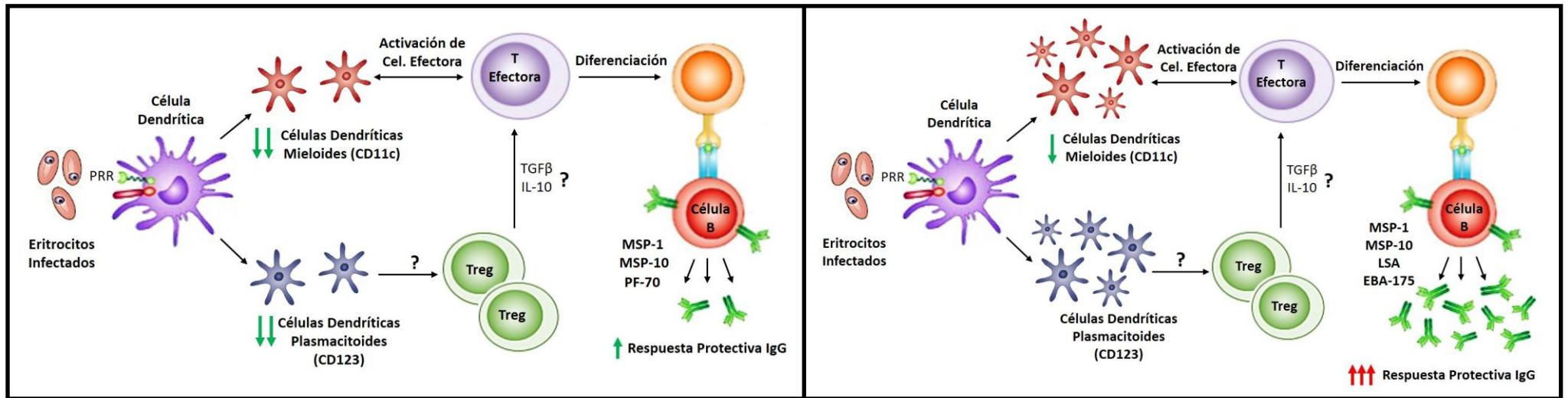


FIGURA 6. Modelo teórico de los resultados obtenidos en la medición de poblaciones celulares (dendrítica y regulatorias) y la respuesta protectora mediada por anticuerpos IgG frente a proteínas recombinantes del estadio asexual de *P. falciparum* en pacientes sintomáticos (en fase aguda de la infección) e individuos asintomáticos provenientes de comunidades de la Amazonía peruana.

I.9. LUGAR Y POBLACION DE ESTUDIO

Las muestras de los pacientes sintomáticos (S), individuos asintomáticos (AS) e individuos controles (C) que participaron en cada estudio experimental de esta tesis, provinieron de comunidades cercanas a Iquitos, provincia de Maynas, Departamento de Loreto, en la Region Amazónica peruana (Figura 7). Las estrategias para la identificación de pacientes fueron las siguientes:

A. Detección de Casos Pasiva (CDP), las muestras de los casos S fueron obtenidas en el Centro de Salud San Juan Bautista, Iquitos, donde los pacientes se presentaron reportando fiebre como síntoma principal. La infección con *P. falciparum* se diagnóstico mediante la gota gruesa y frotis de sangre por microscopía (prueba de oro o “*Gold Standard*” para el diagnóstico de la malaria).

B. Detección de Casos Activa (DCA) y colaterales, el muestreo de individuos AS, aquellos que muestran la presencia del parásito en sangre y no presentaban ningún síntoma aparente relacionado a malaria, estuvo basado en la identificación de colaterales y DCA. Los colaterales fueron identificados por ser familiares o vecinos del “caso índice” (sujeto S diagnosticado con la infección de *P. falciparum* durante la DCP en el Centro de Salud San Juan), visitándolos semanalmente durante un mes para identificar casos adicionales de AS, asumiendo la transmisión local y la adquisición de la infección.

Adicionalmente, la DCA se llevo a cabo en comunidades pequeñas de la zona del Alto Nanay que comprenden Atalaya, Diamante Azul, San Antonio entre otras. Estas comunidades se encuentran localizadas a 6 horas al noreste de Iquitos, yendo en bote a motor “rápido”. Asimismo, se realizó también la DCA en comunidades más cercanas a Iquitos como Santa Clara, Tarapoto, Huaturi y Quistococha (Figura 7).

De la misma manera que los individuos S, la presencia de *P. falciparum* se diagnosticó mediante la gota gruesa y frotis de sangre por microscopía. Por definición, los casos AS presentan muy bajas parasitemias a veces no detectadas por microscopía, por lo que fue importante el diagnóstico por PCR en Tiempo Real

(RT-PCR).

Para todos los casos, tanto S, AS y C la presencia o ausencia del parásito fue confirmada posteriormente con RT-PCR utilizando cebadores específicos de la especie de *Plasmodium* con el ADN extraído de las muestras de sangre seca colectadas en papel filtro [61].

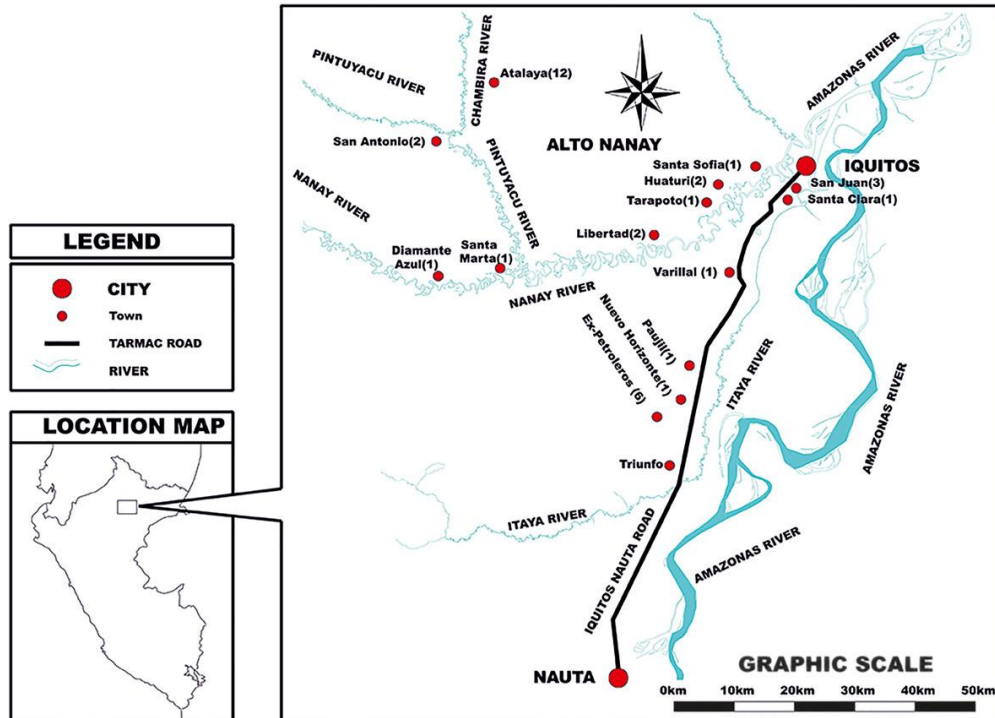


FIGURA 7. Comunidades cercanas a la ciudad de Iquitos donde se realizaron la DCP y la DCA. [Figura tomada de la referencia: Torres K. et. al. *J Infect Dis.* 2015; 211(8):1342-51]

Por otro lado, los individuos controles (C), habitantes de la zona endémica, aseguraron no haber tenido malaria en toda su vida, durante su enrolamiento al proyecto.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, Perú. Todos los pacientes proporcionaron el consentimiento informado debidamente entendido y firmado previo al enrolamiento en el estudio. Los pacientes diagnosticados con *P. falciparum*, después de la toma de muestra recibieron el tratamiento sugerido por el Programa de Control de la Malaria del Ministerio de Salud del Perú.

CAPITULO 2

Comparación de la respuesta *ex vivo* de PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con *P. falciparum* en fase aguda después de la estimulación con diferentes antígenos del parásito

I. INTRODUCCION

Las células T desempeñan un rol primordial en la regulación de la respuesta inmune y la formación de la memoria inmunológica, controlando y eliminando la infección. Los estudios en ratones y seres humanos han demostrado en repetidas ocasiones que las citoquinas proinflamatorias, tales como la interleuquina-12 (IL-12), interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) son mediadores esenciales de la inmunidad protectora generada por antígenos del estadio asexual del parásito [44].

Probablemente hay muchos antígenos de *P. falciparum* que median la inmunidad a través de las células T, de los cuales en el presente estudio se han evaluado a la hemozoina, hemozoina tratada con ADNAsas y la proteína recombinante superficie del merozoito de 42 kDa (MSP1₄₂), así también se han evaluado los ligandos LPS y CpG de los receptores de TLR4 y TLR9 respectivamente, como controles de estimulación en sistema de estimulación de PBMCs *ex-vivo*.

La proteína MSP1 ha sido estudiada ampliamente y es reconocida como una proteína candidata de vacuna [45]. La proteína completa de 195kDa sufre dos eventos de escisión proteolítica sucesivos [46]; la primera produciendo un complejo asociado de forma no covalente formado por los fragmentos p83, p20 y p45 y el fragmento p42 que se encuentra anclada en la membrana del merozoito. El segundo evento de procesamiento se produce inmediatamente antes de la invasión al eritrocito, lo que resulta en la escisión de la molécula p42 en fragmentos p33 y p19. El fragmento de 19kDa permanece unido a la superficie merozoite a través del glicosilfosfatidilinositol (GPI) [47] y se compone de dos dominios como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [48], que pueden desempeñar un papel en el proceso de invasión. Los estudios en la respuesta humoral de anticuerpos dirigidos contra los fragmentos C-terminal de MSP1 (MSP1₁₉ y MSP1₄₂) han sido evaluados ampliamente y se han asociado con la inmunidad en modelos preclínicos [49]. Sin embargo, se conoce muy poco de la respuesta de las células T productoras de citoquinas proinflamatoria y anti-inflamatorias frente a la proteína MSP-1₄₂ importante a ser evaluada en pacientes sintomáticos y asintomáticos de la Amazonía peruana.

El otro antígeno de *P. falciparum* evaluado en este estudio es la Hz, que es un pigmento marrón cristal que se forma en la vacuola digestiva de *Plasmodium* como un producto del catabolismo de la hemoglobina (Hb) [50]. El parásito digiere más del 80% de la Hb en el glóbulo rojo del hospedero y lo utiliza como fuente principal de energía y nutrientes. Sin embargo, este proceso genera grupos hemo libres, los que son altamente tóxicos para el parásito. Debido a que el parásito es incapaz de excretar los grupos hemo libres y no posee la oxigenasa para recuperar el hierro y detoxificar el grupo hemo, lo agrega en un cristal insoluble denominado hemozoina (Hz) por una vía aún desconocida [51].

Tras la ruptura del glóbulo rojo infectado, la Hz es liberada de la vacuola digestiva del parásito y rápidamente fagocitada por macrófagos modulando las funciones de estos fagocitos. En malaria humana y murina, un gran número de fagocitos circulantes que contienen la Hz son secuestrados en varios órganos como el hígado, el bazo y el cerebro en los que se aloja indefinidamente y su presencia ha sido correlacionada con la severidad de la enfermedad; lo que indica que la Hz puede contribuir potencialmente al desarrollo de la inmunopatogénesis en malaria [50-52].

Precisamente, el rol de la Hz en la modulación de la respuestas inmune innata, pro-inflamatoria y antiinflamatoria ha sido investigada en varios estudios utilizando diferentes protocolos de preparación de Hz tomando inclusive la hemozoina sintética (β -hematina) o purificada de cultivos de *P. falciparum*. En algunos casos la Hz purificada de cultivos de *Plasmodium* ha recibido tratamientos adicionales para remover proteínas y/o lípidos y ADN plasmodial.

Se ha sugerido que esta molécula juega un rol importante en la patofisiología durante la infección con malaria, porque activa los macrófagos y células dendríticas para la producción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias [53,54]. En estudios con modelos animales y en humanos se ha observado que la Hz estimula células mononucleares elevando la producción de TNF- α [55,56] y ciertas citoquinas anti-inflamatorias y quemoquinas como IL-10 y MIF [54].

Así, diferentes estudios realizados utilizando la Hz han reportado, por ejemplo, que las CD₄ producen altos niveles de IL-12 en respuesta a la Hz [56,57]. Por otro lado, un

estudio realizado *in vitro* mostró que la producción de IL-12 estuvo regulada finamente por IL-10 en PBMCs estimulados con Hz. Sin embargo, aún existen fuertes discrepancias en cuanto a la inmunogenicidad de la Hz, en las que se sugiere que la Hz por sí misma es inmunológicamente inerte y que la activación inmune dependiente de TLR9 es consecuencia del ADN malarial conjugado con la Hz [57]. Otros estudios *in vivo* mostraron que la Hz libre de ADN es un potente adyuvante, sugiriendo que el ADN no es el activador de la vía de TLR9 [58]. Así también, una investigación propuso que el complejo proteína-ADN es el componente exclusivo del parásito que activa las CDs por la vía dependiente de TLR9 para producir citoquinas inflamatorias y que la Hz no es un inductor directo de la respuesta inmunológica [59].

Por otro lado, estudios previos *in vitro* demostraron que la Hz y GPI de *P. falciparum* fueron capaces de estimular monocitos y macrófagos, dirigiendo la activación y la señalización “*dowstream*” del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) con la translocación de sus subunidades p50 y p65 del citoplasma al núcleo, en la inducción de la vía de expresión de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y óxido nítrico (NO) generando [56].

En este estudio se analizaron los perfiles de citoquinas *ex vivo* en PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum* en presencia de estímulos inmunógenos de *P. falciparum* y estímulos de los TLRs como LPS (TLR4) y CpG (TLR9), en la expresión y secreción de citoquinas y la activación de la subunidad p65 del NFκB para determinar y comparar si hay citoquinas características inducidas por algún estímulo en particular comparable en sintomáticos y asintomáticos.

Objetivos:

1. Optimizar el cultivo y estimulación *ex vivo* de PBMCs de individuos sintomáticos o asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum* con diferentes inmunógenos de *Plasmodium* Hz, HzTx y MSP-1 así como de ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4) CpG, LPS.

2. Evaluar la expresión genética de citoquinas de PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum* estimulados con diferentes inmunógenos de *Plasmodium* Hz, HzTx y MSP1 así como de ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4), mediante qPCR.
3. Evaluar la expresión genética del gen *tlr9* en PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum* estimulados con los diferentes inmunógenos de *Plasmodium* Hz, HzTx y MSP1 así como de ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4), mediante qPCR.
4. Analizar la producción de citoquinas secretadas por los PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum* estimulados con los diferentes inmunógenos de *Plasmodium* Hz, HzTx y MSP1 así como de ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4).
5. Evaluar la presencia de la subunidad p65 del NF- κ B en PBMCs de individuos sintomáticos o asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum* estimulados con los diferentes inmunógenos de *Plasmodium* Hz, HzTx y MSP1 así como de ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4), mediante Western Blot.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y PREPARACIÓN DE LOS PBMCs PARA LA ESTIMULACIÓN

II.1.1 Colección de sangre, separación, criopreservación y descriopreservación de PBMCs

Se colectaron entre 50-60 mL de sangre periférica para la separación de PBMCs de cada paciente S (n=14) e individuos AS (n=13) o C (n=12) en tubos con heparina, adicionalmente se colectaron 6mL de sangre en un tubo sin aditivo para la obtención de suero.

Los PBMCs fueron separados *in-situ*, en el Laboratorio Satélite de Iquitos, mediante la centrifugación en gradiente con Ficoll-Paque Plus de GE Healthcare. Los PBMCs aislados fueron lavados dos veces con la solución tampon Hanks y llevados a 10^7 células/mL en 90% de suero fetal bovino (FBS) inactivado y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) en tubos de criopreservación. Se guardaron los tubos a -80°C por 24 horas en dispositivos de congelamiento de Nalgene, que permite el congelamiento gradual (1°C por minuto) para evitar el daño celular. Pasado este periodo, los viales fueron transportados en hielo seco al Laboratorio de Malaria en Lima, donde finalmente fueron almacenados en nitrógeno líquido (NL) hasta el momento de su uso.

El día de la estimulación de los PBMCs y la medición de células dendríticas por citometría de flujo, se descriopreservaron las células en baño de agua a 37°C , luego se verificó la viabilidad celular utilizando azul de tripan al 0.4% (solamente las muestras con $>85\%$ de viabilidad celular fueron consideradas para el análisis). Finalmente, fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con bicarbonato de sodio 25 mM, HEPES 25 mM, L-glutamine 3 mM y gentamicina 50 mg/mL.

II.2 PREPARACIÓN DE LOS ESTIMULOS PARA EL CULTIVO DE PBMCs

II.2.1 Obtención de Hz

II.2.1.1 Purificación y cuantificación de Hz de *P. falciparum*

Para la purificación de la Hz se utilizaron cultivos sincronizados de la cepa brasilera referencial ITG y de la cepa peruana silvestre F06, con una parasitemia > 5% y presencia de esquizontes maduros.

La purificación de Hz se realizó en el equipo separador magnético MACS® colocando la columna LD que contienen esferas magnéticas, preparandola con 5 mL de tampon PBS 1X pH 7.2 + 0.5% BSA. Se añadió el cultivo de parásitos a la columna LD y sólo los eritrocitos parasitados conteniendo Hz quedaron atrapados en las esferas magnéticas. Una vez que toda la muestra pasó a través de la columna, se añadió el tampon PBS 1X pH 7.2 + 0.5% BSA hasta que empezaron a salir gotas transparentes de la columna. Se retiró la columna del dispositivo, luego se añadieron 5 mL de buffer PBS 1X pH 7.2 + 0.5% BSA. Inmediatamente, utilizando el pistón, se eluyeron las células y la Hz unidas a la columna en un tubo colector estéril. La muestra se almacenó en un tubo colector a -20°C hasta su uso.

Para la purificación se descongeló el tubo colector con hemozoína para ser centrifugado a 2,500 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 1mL de PBS 1X pH 7.2. Se realizó el primer lavado y se centrifugó a 6700 g por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se procedió con el segundo lavado con 1 mL de PBS 1X pH 7.2, el pellet fue resuspendido completamente y se centrifugó a las condiciones anteriores. Antes de centrifugar se sacaron 7 uL del volumen total para una hacer una lámina. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS 1X pH 7.2 + 0.5% de Triton X-100. Se dejó incubar por 1 hora agitando cada 20 minutos en el vortex. Después de la última agitación, se centrifugó a 800 g por 5 minutos. El pellet de Hz se lavó 4 veces con 1 mL de PBS 1X pH 7.2. Una vez terminados los 4 lavados, se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1X pH 7.2 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Por último, para la cuantificación se colocó 100 uL del material resuspendido en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 6700 x g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se colocó 100 uL de NaOH 0.2N, se incubó por 1 hora para que la Hz libere todos los grupos heme. A continuación, se realizó una curva estándar con hemina en una placa con fondo plano partiendo con 200 uL de Hemina. Se traspasaron 100ul de hemina al siguiente pocillo el cual ya contenía 100 uL de NaOH 0.2N y así sucesivamente. En total se hicieron 6 diluciones que tenían 100 uL como volumen final por pocillo. Al final se leyó la placa a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

II.2.1.2 Tratamiento de la Hz con ADNAsas

Una vez realizada la extracción, purificación y cuantificación de Hz de las cepas F06 e ITG con una concentración de 120 µM para cada una, se procedió a preparar el tubo de reacción para el tratamiento con ADNAsas. Para una reacción se consideró: 1 µL de Buffer de ADNasa Turbo, 0.2 µL de ADNasa Turbo y 8.8 µL de Hz, para dar un volumen final de 10 µL. Las condiciones utilizadas para el tratamiento de la Hz en el termociclador fueron de 1 hora a 37°C para dejar que la ADNasa actúe, seguida por 10 minutos a 75°C para degradar la ADNasa, haciendo un tiempo total de 1 hora con 10 minutos. Transcurrido el tiempo se sacaron los tubos y se llevaron a -20°C hasta su uso.

II.2.1.3 PCR diagnóstico para detectar presencia de ADN de Plasmodium en hemozoina

Se utilizó el kit PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®, con cebadores “forward” y “reverse” y agua libre de ADNAsas para la detección del ADN malarial en la Hz. El “master mix” fue preparado en un tubo de 1.5 mL de acuerdo al siguiente orden y cantidades:

Componentes	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (uL)
H ₂ O			6
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®	2X	1X	12.5
Primer Forward (5- TAACGAACGAGATCTTAA-3)	10 uM	0.3 uM	0.75
Primer Reverse (5- GTTCTCTAAGAAGCTTT-3)	10 uM	0.3 uM	0.75
Muestra problema			5
Volumen total			25

Las condiciones del PCR para la detección de ADN malarial se muestran a continuación: Desnaturalización inicial a 95°C x 2 minutos (una vez), desnaturalización a 95°C x 20 segundos, hibridación a 52°C x 20 segundos y extensión a 68°C x 30 segundos (45 veces) y una extensión final 68°C x 3 minutos (una vez).

Se realizó la electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 2% para determinar la amplificación de los productos de PCR. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Se usó como referencia un marcador de 100 pb. Finalmente se observaron los resultados en el analizador de imágenes con trans-iluminador UV Bio-Rad®.

Los resultados mostraron que los tratamientos de Hz de las cepas las cepas ITG y F06 con ADNasas no tenían presencia de ADN de *Plasmodium*, mientras que la Hz no tratada con ADNasas, de ambas cepas, sí presentaba ADN. El control positivo también presentó ADN de *Plasmodium* y el blanco no mostró amplificación del producto (Figura 1).

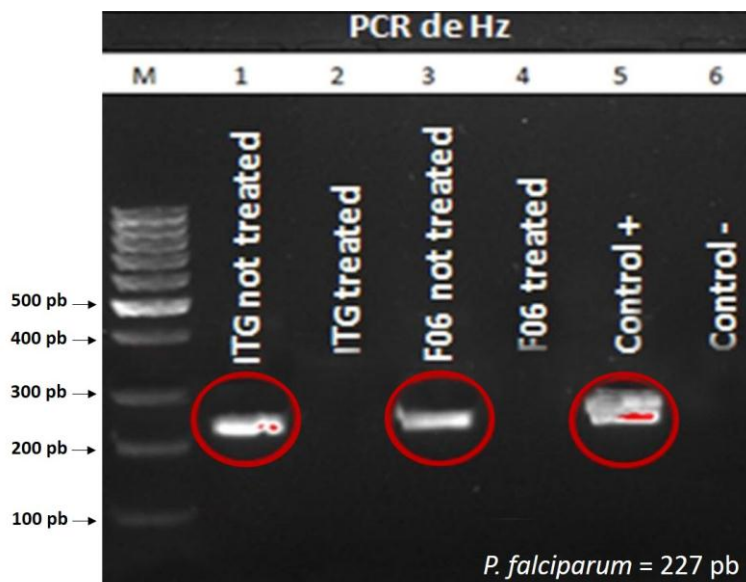


FIGURA 1. PCR de la hemozoina natural no tratada (Hz) y tratada con ADNasa Turbo (HzTx).

II.2.2 Oligonucleotidos (CpG)

Son moléculas sintéticas cortas de cadena sencilla de ADN que contienen dinucleótidos CpG no metilados. Es el agonista del TLR9 y fue obtenida comercialmente como CPG ODN 1668 (CpG, 5 mM, Sigma).

II.2.3 Proteína de superficie del merozoito (MSP1)

La proteína de superficie del merozoíto de *P. falciparum* interactúa con el receptor de membrana del eritrocito para la invasión. La proteína recombinante de 42kDa fue donada por el Dr. David L. Narum (Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology, NIH-USA).

II.2.4 Lipopolisacarido (LPS)

Es el agonista del TLR4 y un adyuvante natural, sintetizado por bacterias gram-negativas. Obtenida comercialmente como lipopolisacarido B5:055 de *Escherichia coli* (LPS, 1ug/mL, Sigma).

II.2.5 Fitohemaglutinina (PHA)

La Fitohemaglutinina posee un excelente grado de actividad mitogénica, que estimula la proliferación en cultivos de diferentes estirpes celulares, incluido los linfocitos, en los que también actúa sobre los procesos bioquímicos relacionados con la respuesta inmune.

II.3 CULTIVO DE PBMCs *ex vivo*

Los PBMCs aislados y descriopreservados de pacientes S (n=14), individuos AS (n=13) y C (n=12) fueron cultivados en el medio de cultivo RPMI-1640 de Sigma-Aldrich enriquecido con 10% de SFB a una densidad de 5×10^6 células por pocillo (para el experimento de extracción de proteínas nucleares) y 2×10^6 células por pocillo (para el experimento de expresión de genes) en una placa de 24 pozos e incubados a 37°C con 5% de CO₂. Después de la descriopreservación, las células se mantuvieron de 3-4 horas en la incubadora hasta que fueron estimuladas con el agonista sintético de TLR9, el CpG (1 µg/ml), la proteína recombinante MSP-1 (10µg/mL), Hz purificada (6 µM/mL), Hz tratada con ADNAsas (HzTx) (6 µM/mL), el agonista de TLR4, el LPS (1 µg/mL) y PHA (10µg/mL), asimismo se utilizó medio RPMI como control negativo (Nil).

Se incubaron los PBMCs estimulados por 16 horas en una incubadora de cultivos celulares a 37°C y 5% de CO₂.

II.4 EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES DE CITOQUINAS

II.4.1 Extracción de ARN de PBMCs estimulados con los diferentes antígenos

Después del cultivo de 16 h los sobrenadantes fueron removidos. Los PBMCs fueron centrifugados a 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, los “pellets” celulares fueron lisados, homogenizados y el ARN total fue extraído utilizando el RNeasy Plus Mini Kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN fue eluido en 20 µl de agua libre de ARNAsas y 1 µg fue sometido a transcripción reversa para obtener el ADNc.

II.4.2 Cuantificación y Digestión de ADN genómico del producto de extracción de ARN

II.4.2.1 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN se realizó utilizando el kit de cuantificación “Quant-iT™ RNA Assay Kit” de Life Technologies. El kit utiliza dos estándares, en un tubo se agregó 10 µL del estándar #1 (0 ng/mL) y en otro tubo 10 µL del estándar #2 (10 ng/mL). Por cada muestra a cuantificar, incluyendo los dos estándares, se preparó 199 µL de la solución tampón del RNA Assay Kit dilution y 1 µL de fluorocromo, obteniendo un total de 200 µL. De esta preparación, se utilizó 198 µL y 190 µL con 2 µL de ARN y 10 µL de los estándares respectivamente. La lectura de la cantidad de ARN de las muestras se realizó utilizando el fluorómetro Qubit™ de Invitrogen, previa calibración con los estándares. El fluorómetro dio los valores de la concentración de las muestras en ng/mL.

II.4.2.2 Tratamiento con ADNasas

Con la finalidad de eliminar cualquier rastro de ADN en las muestras de ARN, se realizó un tratamiento con ADNasas utilizando sistema Turbo™ Dnase 2U/µL de Ambion, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La preparación del master mix para la digestión de rastros de ADN se muestra en la Tabla 1. La reacción se incubó a 37°C por 30 minutos, al cabo de los cuales se agregó 1 µL de la solución que detiene la actividad de la ADNasa. Se incubó la reacción a 75°C por 10 minutos para inactivar la ADNasa. Finalmente, se incubó la reacción a 65°C por 10 minutos para la denaturación de estructuras secundarias del ARN, todo realizado en el Termociclador BioRad T100.

Componente	Concentración	Volumen para 1	Concentración
	inicial	Reacción	final
Buffer	10 X	1 μ L	1 X
H ₂ O RNase-free™	-	(CSP. 8.8 μ L)	
ARN total	-	-	500 ng
DNase TURBO	2U/ μ L	0.2 μ L	0.2U
Volumen final		10ul	

TABLA 1. Preparación de componentes para la digestión enzimática del ARN total con enzima TURBO™ DNase (2 U/ μ L) TURBO

Adicionalmente, se incluyó una muestra, la cual debe seguir el mismo procedimiento. Este tubo será posteriormente utilizado en el procedimiento de síntesis del ADN codante (ADNc) a la cual no se le adicionará la enzima de transcripción reversa (control sin transcriptasa reversa=NRT). Finalizado el procedimiento los tubos fueron puestos en hielo para evitar la formación de estructuras secundarias.

II.4.3 Transcripción reversa

La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit de síntesis Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR de Thermo Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante. Este Kit utiliza la Enzima Maxima Reverse Transcriptase, una enzima avanzada derivada de la evolución *in vitro* de M-MuLV RT y el Mix de reacción que contiene, solución tampón de reacción, dNTPs, Oligo (dT)₁₈ y cebadores “Random” hexámeros.

La preparación del “master mix” para la transcripción del ARN se muestra en la Tabla 2. La reacción se incubó a 25°C por 10 minutos, luego a 65°C por 30 minutos y finalmente, se incubó la reacción a 85°C por 5 minutos, todo realizado en el Termociclador BioRad T100.

Componentes	Concentración	Volumen para 1	Concentración
	inicial	Reacción	final
Mix de Reacción	5X	4 μ L	1X
Enzima	-	2 μ L	-
Transcriptasa			
H ₂ O	(CSP. 20 μ L)	4 μ L	-
ARN	1 pg – 5 ug	10 μ L	500 ng
Volumen Final		20 μ L	

TABLA 2. Preparación de componentes para la Síntesis de ADNc con el kit de síntesis Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR.

La cantidad total final de ADNc transcrito fue de 500 ng. Finalizado todo el procedimiento las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

II.4.4 Ensayo de cuantificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR) en Tiempo Real

Para el análisis de expresión relativa de los genes de citoquinas se utilizaron los siguientes genes: *tnf- α* , *ifn- γ* , *il-10*, *tgf- β* , y el gen del receptor *tlr9* utilizando como normalizadores genes que se expresan constantemente, gen de la *β -Actina* y la *β -2-microglobulina*.

El ADNc resultante en la transcripción reversa fue diluido 10 veces y se colocaron 2 μ L de esta dilución en 25 μ L de reacción para la PCR cuantitativa con la finalidad de observar el perfil de expresión de los genes (Tabla 3).

Cebadores	Oligonucleotidos de extensión “forward” y “reverse”
<i>b2m</i> -F	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT
<i>b2m</i> -R	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
<i>actb</i> -F	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
<i>actb</i> -R	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
<i>tnf-α</i> F	CACGCTCTTCTGCCTGCT
<i>tnf-α</i> R	CAGCTTGAGGGTTTGCTACA
<i>ifn-γ</i> F	TCCCATGGGTTGTGTGTTTA
<i>ifn-γ</i> R	AAGCACCAGGCATGAAATCT
<i>il-10</i> F	CGTGGAGCAGGTGAAGAATG
<i>il-10</i> R	AGAGCCCCAGATCCGATTTT
<i>tgf-β1</i> F	TGAACCGGCCTTTCTGCTTCTCATG
<i>tgf-β1</i> R	GCGGAAGTCAATGTACAGCTGCCGC
<i>tlr9</i> F	TGTAATAACAGTTGCCGTCCAT
<i>tlr9</i> R	CAGCCTTTCCTTGTCCTCC

TABLA 3. Secuencia de cebadores utilizados en PCR en Tiempo Real

Todos los ensayos de cuantificación de expresión genética por PCR en tiempo real se llevaron a cabo en el Termociclador CFX Connect de BioRad, utilizando el Light Cycler 480 SYBR Green I Master de Roche que contiene FastStart Taq DNA Polymerase, solución tampón de reacción, Mix de dNTP (dUTP en lugar de dTTP), SYBR Green I dye y MgCl₂. En cada experimento de qPCR se incluyeron los siguientes controles negativos: i) controles negativos de la síntesis de ADNc (sin transcriptasa reversa) y ii) controles sin muestra. El valor de C_T para cada muestra fue calculado como el ciclo en el cual se detectó por primera vez fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo. Cada muestra se analizó por duplicado. Los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 4.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, luego 40 ciclos con 15 segundos a 65 °C, 25 segundos a 60 °C y 25 segundos a 72°C, y finalmente 5 minutos de un incremento gradual de temperatura a 72, 75 y 95 °C.

Componente	Concentración	Volumen para 1	Concentración
	inicial	Reacción	final
Primer Forward (10 µM)	10 µM	0.48 µL	300nM
Primer Reverse (10 µM)	10 µM	0.48 µL	300nM
H ₂ O-PCR	-	5.04 µL	
SYBR Green I Master		5 µL	
ADNc		5 µL	10ng
Volumen Final		16 µL	

TABLA 4. Preparación de componentes para la PCR en Tiempo Real.

Para calcular la eficiencia de cada primer, correspondiente a un gen, se utilizó el Ct obtenido y el Logaritmo de la concentración de ADNc (ng). Se realizó una curva de calibración cuya pendiente permitió calcular la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la Ecuación $E = 10^{-1/m}$; donde E, eficiencia de la amplificación; m, la pendiente de la recta. La eficiencia de la PCR debería ser de aprox. 90-100%. Para hallar el porcentaje se calculó mediante la siguiente formula $(E-1) \times 100 = 100\%$ ó $E = 2$ (Tabla 5).

	Tm	Tamaño del producto	Concentración	Eficiencia
	(producto)	(bp)	de cebadores	
<i>tnf</i>	85°C	161	300nM	100%
<i>ifn</i>	80.5°C	198	300nM	91%
<i>il-10</i>	80°C	195	300nM	98%
<i>tgf-β</i>	88°C	152	300nM	100.4%
<i>tlr9</i>	88°C	344	300nM	100.53%
<i>b2m</i>	82°C	86	300nM	98%
<i>actb</i>	87.5°C	140	300nM	96%

TABLA 5. Especificaciones y características de *tnf-α*, *ifn-γ*, *il-10*, *tgf-β*, y el gen del receptor *tlr9* en el qPCR.

Los dos genes más estables (b-actina y b-2-microglobulina), los cuales subsecuentemente fueron utilizados para determinar el factor de normalización para cada muestra, de acuerdo a lo descrito por *Vandesompele et al.* [62]. Los niveles de expresión (normalizados) se obtuvieron dividiendo las cantidades relativas de expresión entre el factor de normalización, es decir los niveles de expresión de *tnf- α* , *ifn- γ* , *il-10*, *tgf- β* , y el gen del receptor *tlr9* fueron normalizados con el factor de normalización de los genes de referencia (β -Actina y la β -2-microglobulina), mientras que estos últimos fueron normalizados entre sí.

Se utilizó el Programa de Análisis qBase Plus 2.3 que calcula la eficiencia de amplificación de cada gen para determinar la expresión relativa (RQ) de cada gen en cada muestra. El RQ fue determinado con el método de la diferencia de C_T . Específicamente el valor de C_T de un gen para una muestra fue relacionado al valor de C_T del mismo gen en la muestra con el más alto nivel de expresión (menor C_T), tomando la eficiencia de amplificación de este gen en el PCR. Esto se hizo para cada uno los genes evaluados. $RQ > 1$ se consideraron niveles de expresión elevados y $RQ < 1$ fueron considerados como niveles de expresión baja o basales.

Para evaluar la expresión relativa de los genes estudiados en los diferentes grupos y con los diferentes estímulos se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney. Los niveles de significancia fueron establecidos con un $P < 0.05$ para todos los análisis.

II.5 MEDICIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE

La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de PBMCs de S, AS y C fueron determinados utilizando el kit de perlas fluorescentes “FlowCytomix human Th1/Th2 11 plex kit” de eBioscience, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sobrenadantes de los PBMCs estimulados o los estándares en dilución seriada fueron resuspendidos con las perlas fluorescentes, que están cubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para cada citoquina, además los anticuerpos monoclonales específicos biotinilados como conjugados. Seguido de la incubación, las perlas fueron lavadas e incubadas con estreptavidina conjugada con PE. Para cada análisis se colectaron 3000 perlas fluorescentes. Los voltages de “Forward” y “Side”

scatter fueron ajustados con las perlas, el detector de 675nm fue utilizado para diferenciación y el detector de 575nm fue utilizado para la cuantificación de la perla.

La curva estandar fue determinada para cada citoquina en el rango de 27 a 20000 pg/mL. Los límites más bajos de detección para cada citoquina se encuentran entre 0.5–20.8 pg/mL de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las citoquinas fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur de Beckton Dickinson y las concentraciones fueron evaluadas utilizando el software FlowCytomix Pro 2.1 de Bender MedSystems.

Para comparar los valores de cada variable, los niveles de citoquinas en los diferentes grupos de estudio y los diferentes estímulos, se utilizo la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis. Los niveles de significancia fueron establecidos con un $P < 0.05$ para todos los análisis.

II.6 ACTIVACIÓN DE LA SUBUNIDAD p65 DEL NFκB

II.6.1 Preparación de los extractos nucleares

Después de la incubación de los PBMCs por 16 horas, las células fueron centrifugadas a 12,000 x g por 5 minutos y los extractos nucleares fueron preparados a microescala de la siguiente manera: Después de la centrifugación, las células fueron resuspendidas en 100 µl de la solución tampón CE frio (HEPES 10 mM a un pH 7.9, KCl 10mM, EGTA 0.1 mM y EDTA 0.1 mM). Después de 10 minutos en hielo, se agregó 6.25 µl de NP-40 10% de Sigma-Aldrich y el lisado fue agitado vigorosamente en el vortex por 10 segundos y centrifugado por 1 minuto a 12,000 x g a 4°C. Los sobrenadantes fueron removidos y el pellet fue resuspendido en 20 µl de la solución tampón NE frio (HEPES 20 mM a un pH 7.9, NaCl 420 mM, EDTA 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y glicerol 25%) por 10 minutos agitando continuamente. Ambas soluciones tampon contenian un cocktail inhibidor de proteasas HALT de Thermo Scientific. El debris celular fue removido por centrifugación y los sobrenadantes fueron congelados a -80°C hasta su uso.

II.6.2 Western blot

Los extractos nucleares (7uL) fueron sometidos a electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium 0.45um de la marca Bio Rad). Después de 16 horas de transferencia, se bloquearon las membranas con solución tampón TBST (Tris 20mM, NaCl 150mM, pH 7.5, Tween 20 0.01%, pH 7.5) y BSA 5%. Posteriormente las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos en el sistema *SNAP i.d. 2.0 (Protein Detection System)*: Anticuerpo primario monoclonal anti-NFK β p65 1:2750 de (ABCAM) y el anticuerpo secundario policlonal Rb IgG conjugado con HRP 1:5000 (ABCAM). Se reveló con un 1mL de solución 1:2 de Solución A (Luminol Enhancer Solution) y Solución B (Peroxide Solution) ambas de la marca GE Helthcare y se visualizó en film fotográfico CL-XPosureTm Film de la marca Thermo Scientific.

III. RESULTADOS

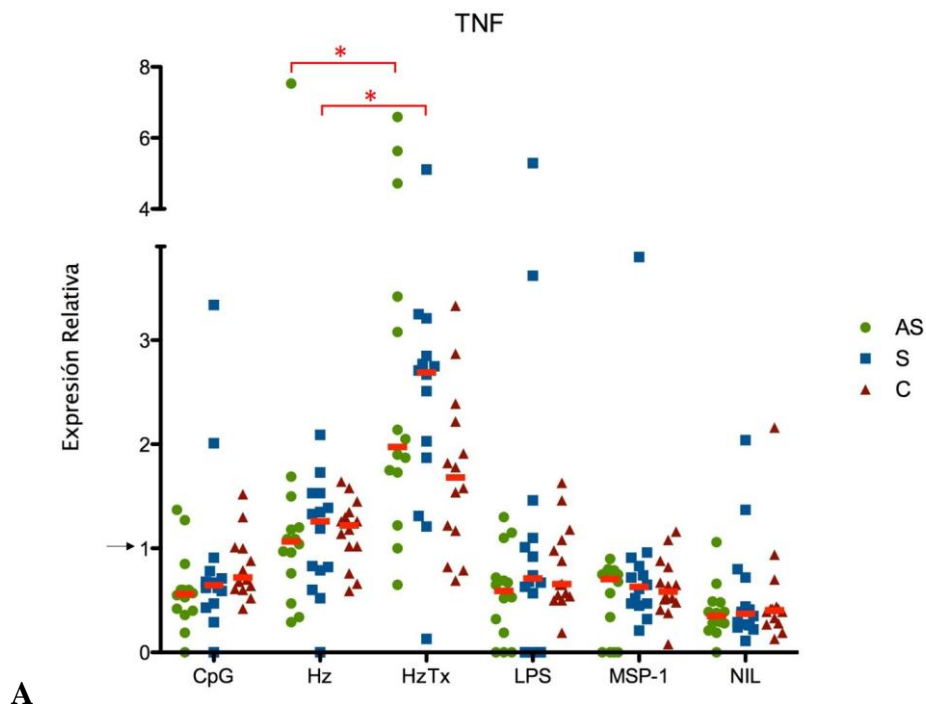
III.1 Comparación relativa de los niveles de expresión de los genes de citoquinas mediante el ensayo en PCR en Tiempo Real

III.1.1. Expresión relativa de los genes de citoquinas *tnf- α* e *ifn- γ*

En la Figura 2 se muestra la comparación de la expresión relativa de los genes de citoquinas *tnf- α* e *ifn- γ* en los PBMCs estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 en S, AS y C, realizados con el ensayo de PCR en Tiempo Real.

Se observó que el gen *tnf- α* presenta una mayor expresión relativa en pacientes S cuando los PBMCs son estimulados con Hz y HzTx (RQ=1.18 y 2.03, respectivamente). La expresión relativa de *tnf- α* con CpG, LPS y MSP1 en S, AS y C es baja comparados con los niveles de expresión de los PBMCs no estimulados (Nil) (Figura 2A).

La expresión relativa de *ifn- γ* en los PBMCs de pacientes S, AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx y MSP1 fue baja (RQ=0.26, 0.73, 1.09 y 0.4, respectivamente). Asimismo, se observó una ligera expresión relativa alta en los pacientes S e individuos AS y C estimulados con LPS (RQ=2.35, 1.08 y 1.2, respectivamente) (Figura 2B).



B

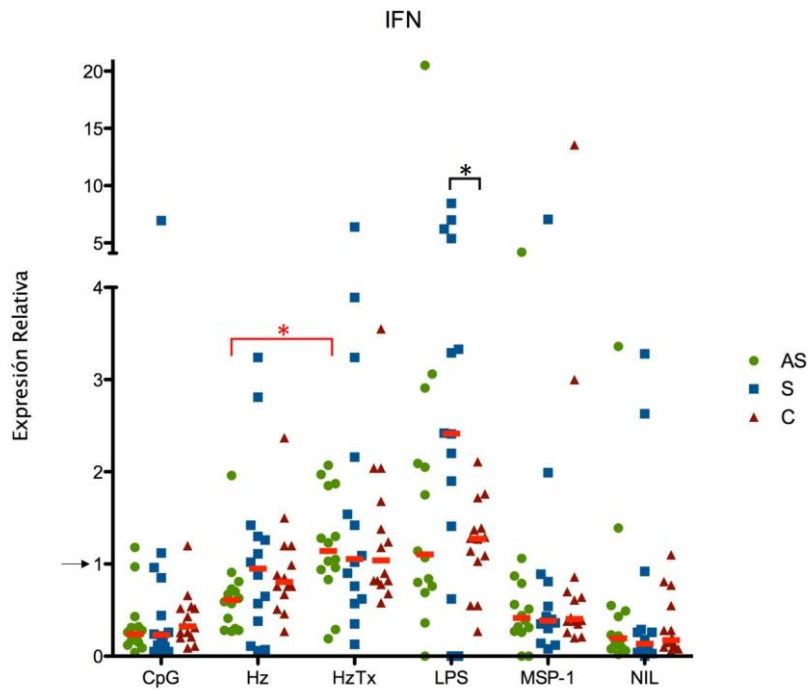


FIGURA 2. Expresión relativa de los genes *tnf* (A) e *ifn-γ* (B) en PBMCs de pacientes S e individuos AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 por qPCR. La flecha en el eje Y indica valores $RQ > 1$ niveles de expresión elevados, $RQ < 1$ niveles de expresión basales.

III.1.2. Expresión relativa de los genes de citoquinas *il-10* y *tgf-β*

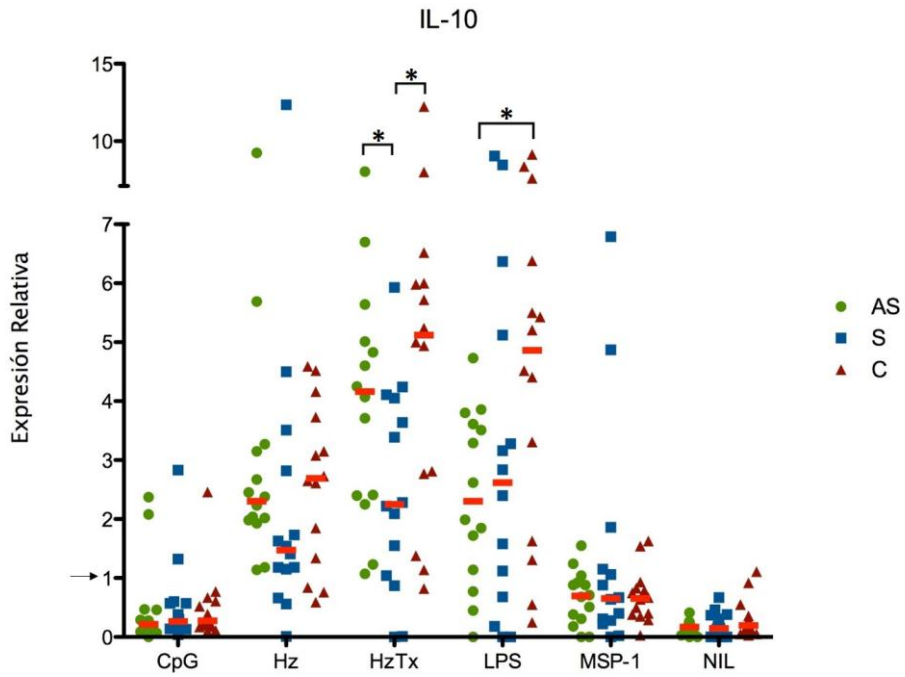
En la Figura 3 se muestra la comparación de expresión relativa de los genes de citoquinas *il-10* y *tgf-β* en los PBMCs estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 en S, AS y C, realizados con el ensayo de PCR en Tiempo Real.

La expresión relativa del gen de *il-10* fue elevada en individuos AS (RQ=4.06) y C (RQ=5.09) cuando los PBMCs fueron estimulados con HzTx comparado a los S (RQ=1.38) ($p<0.05$). Mientras que la expresión relativa en los PBMCs de AS, S y C estimulados con Hz presentaron RQ=2.58, 1.46 y 2.75, respectivamente. La expresión de *il-10* estimulados con CpG y MSP1 en S, AS y C es similar a la expresión en los PBMCs no estimulados (Nil) (Figura 3A).

La expresión relativa de *il-10* en los PBMCs de S, AS y C estimulados con LPS también es elevada en los AS, S y C (RQ=4, 2.7 y 4.94, respectivamente) siendo mayor en C seguido de los AS ($p<0.05$). (Figura 3A).

Por otro lado, los niveles de expresión de *tgf-β* son basales en todos los grupos de estudio estimulados con CpG, Hz, LPS y MSP1; excepto con HzTx donde la expresión relativa de *tgf-β* en AS, S y C es ligeramente mayor (RQ=1.42, 1.31 y 1.22, respectivamente). (Figura 3B).

A



B

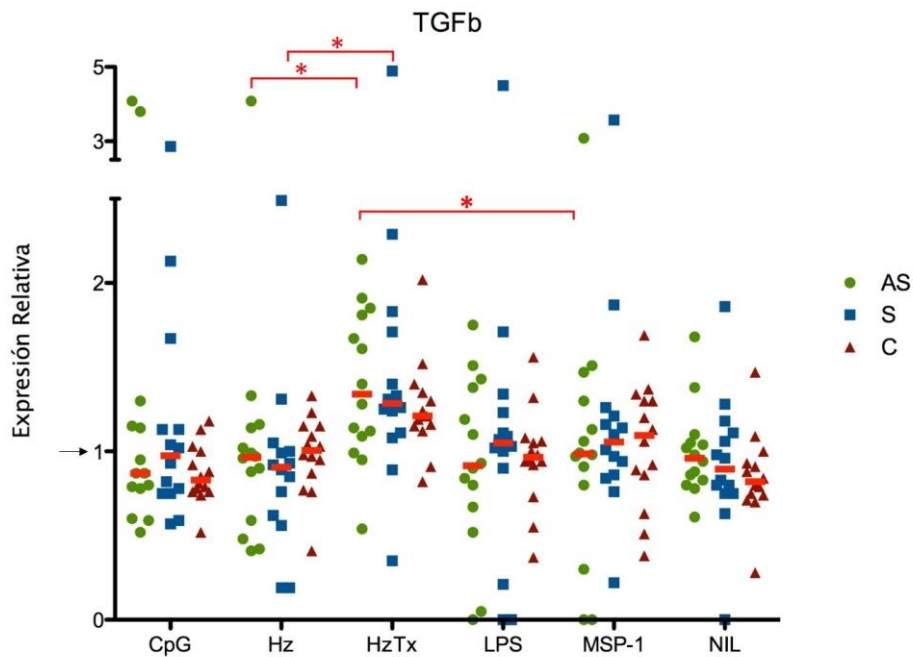


FIGURA 3. Expresión relativa de los genes *il-10* (A) y *tgf- β* (B) en PBMCs de pacientes S e individuos AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 por qPCR. La flecha en el eje Y indica valores RQ>1 niveles de expresión elevados, RQ<1 niveles de expresión basales.

III.1.3. Expresión relativa del gen de *tlr9*

En la Figura 4 se muestra la comparación de la expresión relativa del gen *tlr9* en los PBMCs estimulados con CpG, Hz, HzTx y MSP1 en S, AS y C, realizados con el ensayo de PCR en Tiempo Real.

La expresión relativa del gen de *tlr9* es mayor en pacientes S cuando los PBMCs son estimulados con HzTx y LPS (RQ=1.52 y 1.49, respectivamente). Asimismo, también se observaron niveles de expresión de *tlr9* en los PBMCs de AS con CpG y LPS (RQ=1.50 y 1.78, respectivamente) aunque no muestras diferencias estadísticamente significativas. La expresión de *tlr9* de los PBMCs estimulados con HZ y MSP1 en S, AS y C fue baja como la expresión en los PBMCs no estimulados (Nil) (Figura 8).

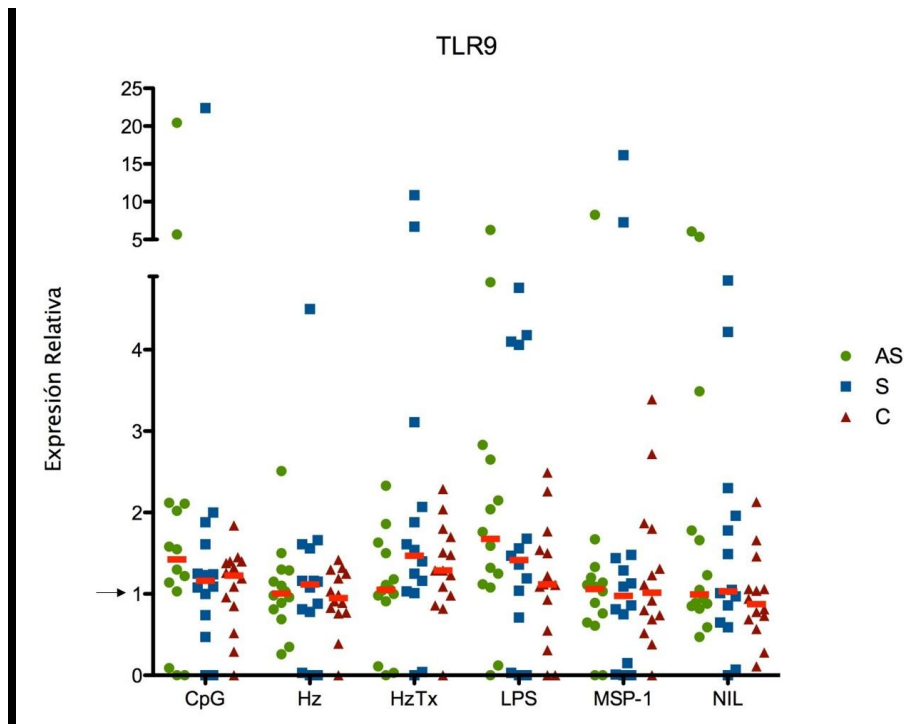


FIGURA 4. Expresión relativa del gen *tlr9* en PBMCs de pacientes S e individuos AS y C estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPS y MSP1 por q PCR. La flecha en el eje Y indica valores RQ>1 niveles de expresión elevados, RQ<1 niveles de expresión basales.

III. 2 Evaluación de la producción de citoquinas en sobrenadante de PBMCs estimulados

I.2.1 Evaluación de la producción de citoquinas en PBMCs de S, AS y C frente a los diferentes estímulos CpG, Hz, HzTx y MSP1

Por otro lado, para determinar si los hallazgos observados en la expresión de genes de citoquinas fueron también manifiestos en la síntesis y secreción de proteínas de citoquinas, se evaluó la respuesta *ex-vivo* en el sobrenadante de los PBMCs estimulados con Hz, HzTx y la proteína recombinante MSP-1 en pacientes sintomáticos e individuos asintomáticos y controles endémicos.

La concentración de la secreción de citoquinas fueron evaluadas en el sobrenadante de los PBMCs estimulados con CpG, Hz, HzTx y MSP1; y no estimulados después de 16 h de incubación. Se evaluaron las siguientes citoquinas: IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α y TGF- β .

Las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-12 mostraron concentraciones por debajo del límite de detección (16.4, 20.8, 1.6 y 1.5 pg/mL respectivamente) por lo que no fueron considerados en el análisis. Las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α mostraron valores difíciles de predecir ya que mostraban anomalías en el resultado posiblemente debido a que presentaban valores muy elevados (*Datos suplementarios: Tabla 1*).

Los niveles de IFN- γ fueron en general bajos mostrados sólo en algunos pacientes frente a los diferentes estímulos sin presentar diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).

Respecto a IL-10, se observaron niveles incrementados de esta citoquina en los PBMCs que fueron estimulados con Hz y HzTx (2926 pg/mL [0-52458], 1888 pg/mL [0-56787] respectivamente), comparado a los PBMCs no estimulados (Nil) (1543 pg/mL [0-46909]), con una significancia estadística de $p=0.0002$ entre Nil vs. Hz y $p<0.0001$ entre Nil y HzTx (Figura 6).

Asímismo, se observó que los niveles de TGF- β en los PBMCs que fueron estimulados con CpG, Hz, HzTx y MSP1 mostraron niveles estadísticamente no

significativos entre los diferentes estímulos (0 pg/mL [0-116], 0 pg/mL [0-148.7], 0 pg/mL [0-153.6] y 0 pg/mL [0-331.7], respectivamente), (Figura 7).

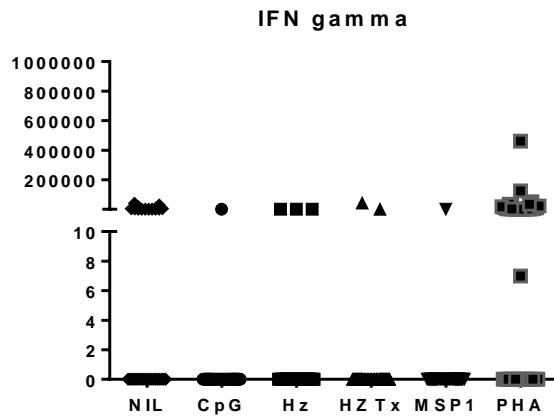


FIGURA 5. Niveles de IFN- γ por estímulo (CpG, Hz, HzTx, MSP1) en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación.

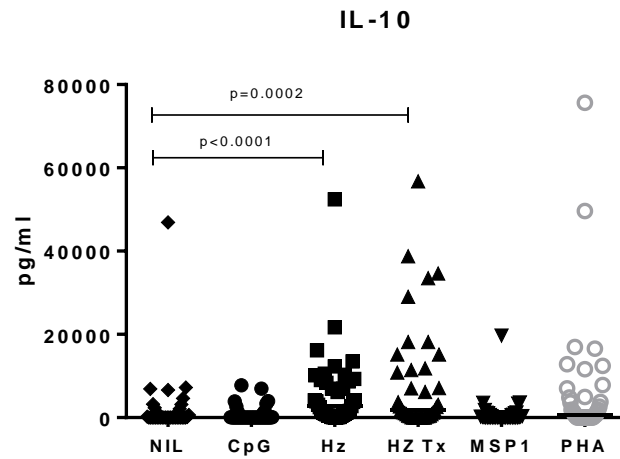


FIGURA 6. Niveles de IL-10 por estímulo (CpG, Hz, HzTx, MSP1) en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación.

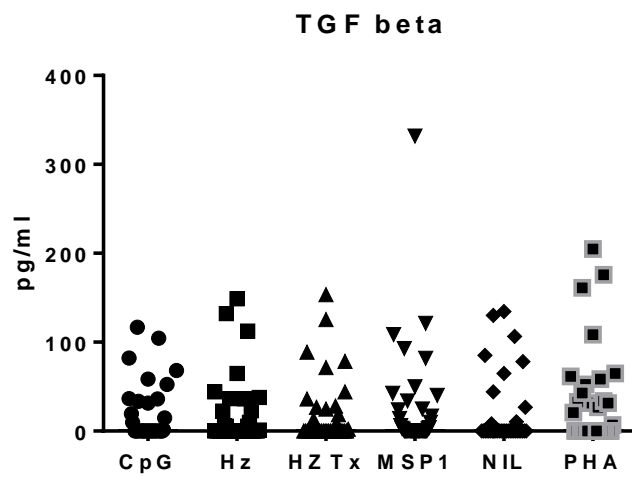


FIGURA 7. Niveles de TGF- β por estímulo (CpG, Hz, HzTx, MSP1) en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación.

III.2.2 Evaluación de la producción de IFN- γ sin estímulo en pacientes S, individuos AS con infección aguda por *P. falciparum* e individuos C

Los resultados mostraron expresión espontánea de IFN- γ en los PBMCs no estimulados (Nil) de pacientes S (24166 pg/mL [0-41063]) comparado a los AS (0 pg/mL [0-478]). Los PBMCs de los individuos C no mostraron niveles de IFN- γ (Figura 8).

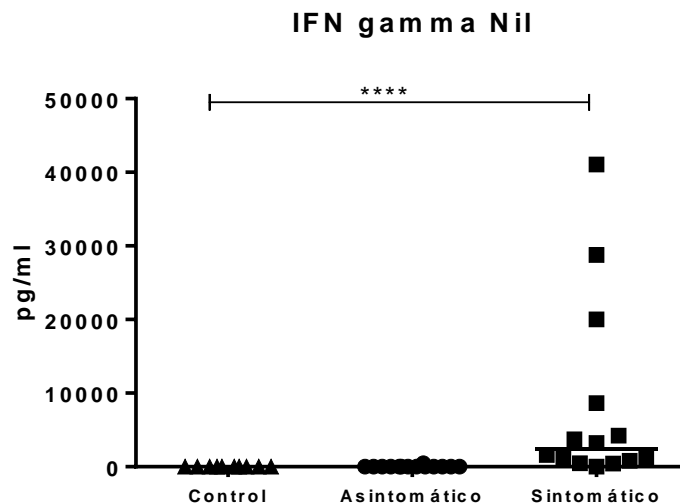


FIGURA 8. Niveles de IFN- γ en el sobrenadante de los PBMCs de pacientes S e individuos AS y C no estimulados (Nil) después de 16 h de incubación.

III.2.3 Evaluación de la producción de IL-10 frente a cada estímulo en pacientes S, individuos AS con infección aguda por *P. falciparum* e individuos C

Se observaron niveles incrementados de IL-10 en los PBMCs no estimulados (Nil) de los pacientes S (2230 pg/mL [0-7211]) comparado con los niveles de IL-10 de PBMCs no estimulados de individuos AS y C (0 pg/mL [0-635], 0) respectivamente, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (Figura 9A).

Los PBMCs estimulados con Hz de los pacientes S (1537 pg/mL [0-12305]), de individuos AS (3833 pg/mL [107-52458]) e individuos C (5029 pg/mL [19.8-16169]) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-10 (Figura 9B).

Los PBMCs estimulados con HzTx de los individuos AS (4948 pg/mL [79.2-56787]) e individuos C (11082 pg/mL [0-38734]) presentaron altos niveles de IL-10 comparado a los pacientes S (154 pg/mL [0-10853]) con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0006$) (Figura 9C).

Finalmente, los PBMCs estimulados con la proteína recombinante MSP1 de los pacientes S (0 pg/mL [0-56]), de individuos AS (217 pg/mL [0-19677]) e individuos C (94.7 pg/mL [0-1231]) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-10 (Figura 9D).

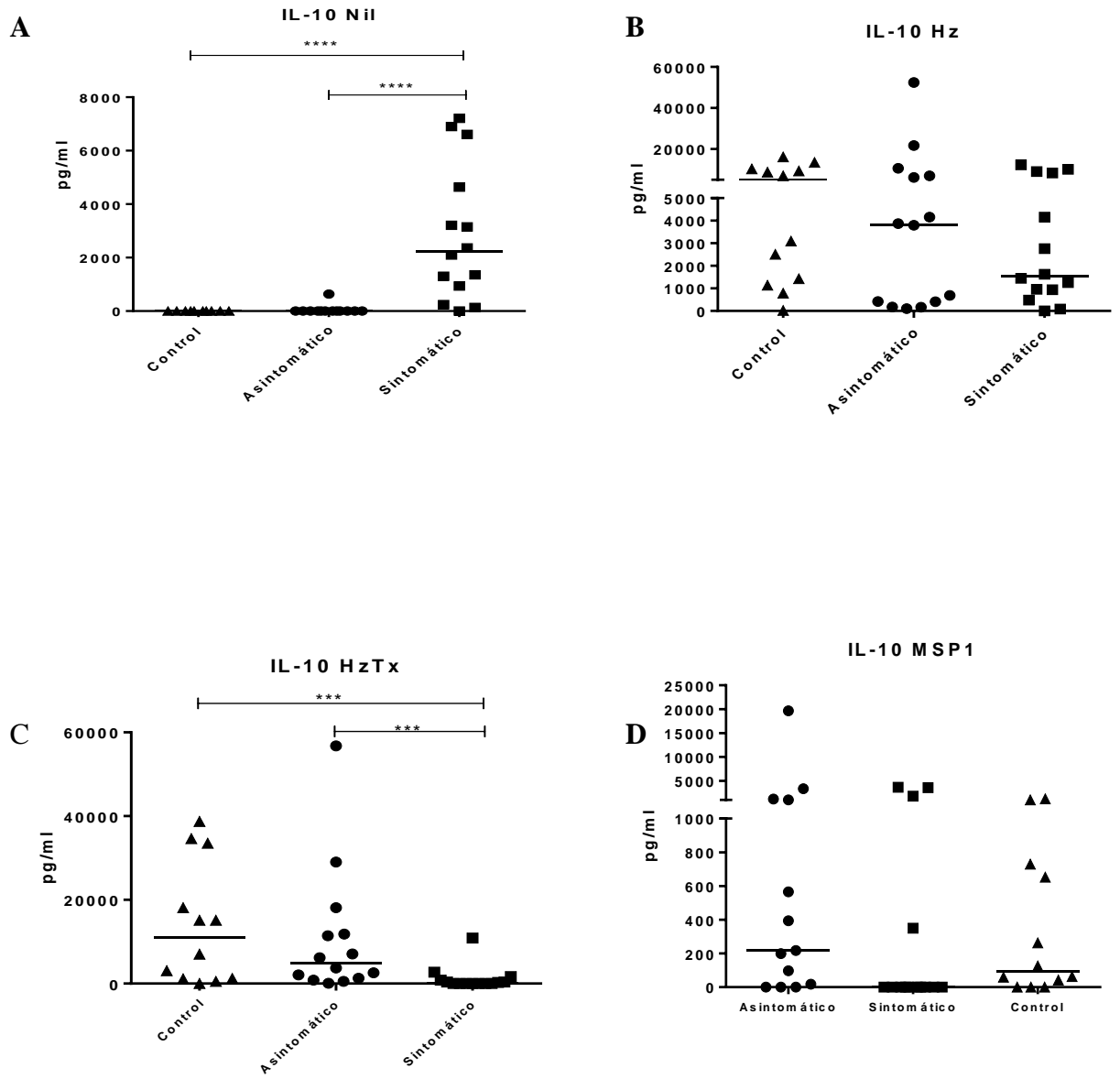


FIGURA 9. Niveles de IL-10 en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación de pacientes S e individuos AS y C. (A) Nil, (B) Hz, (C) HzTx y (D) MSP1.

III.2.4 Evaluación de la producción de TGF-β frente a cada estímulo en pacientes S, individuos AS con infección aguda por *P. falciparum*

Se observaron niveles incrementados de TGF-β en los PBMCs no estimulados (Nil) de los individuos AS y C (2.7 pg/mL [0-106.4], 0 pg/mL [0-134.5]) respectivamente, comparado a los niveles de TGF-β de PBMCs no estimulados de los pacientes S (0 pg/mL), con una diferencia estadísticamente significativa entre S vs. AS (p=0.014) (Figura 10A).

Los PBMCs de los individuos AS estimulados con Hz, mostraron niveles mas altos de TGF-β (3.3 pg/mL [0-106.4]), comparado a los pacientes S (0 pg/mL [0-22.8]) e individuos C (2.75 pg/mL [0-112.6]) con diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) (Figura 10B).

Los PBMCs estimulados con HzTx de los individuos C (0 pg/mL [5.9-153.6]) presentaron niveles mas elevados de TGF-β comparados a los individuos AS (0 pg/mL [0-88.9]) y pacientes S (0 pg/mL [0-44.1]) con diferencias estadísticamente significativas entre C vs S (p=0.01) (Figura 10C).

Finalmente, los PBMCs estimulados con la proteína recombinante MSP1 de los individuos C (23.95 pg/mL [0-331.7]) e individuos AS (6.1 pg/mL [0-121.1]) presentaron niveles mas altos de TGF-β comparados a los pacientes S (0 pg/mL [0-24.7]) con diferencias estadísticamente significativas p<0.05 entre C vs. AS y AS vs.S (Figura 10D).

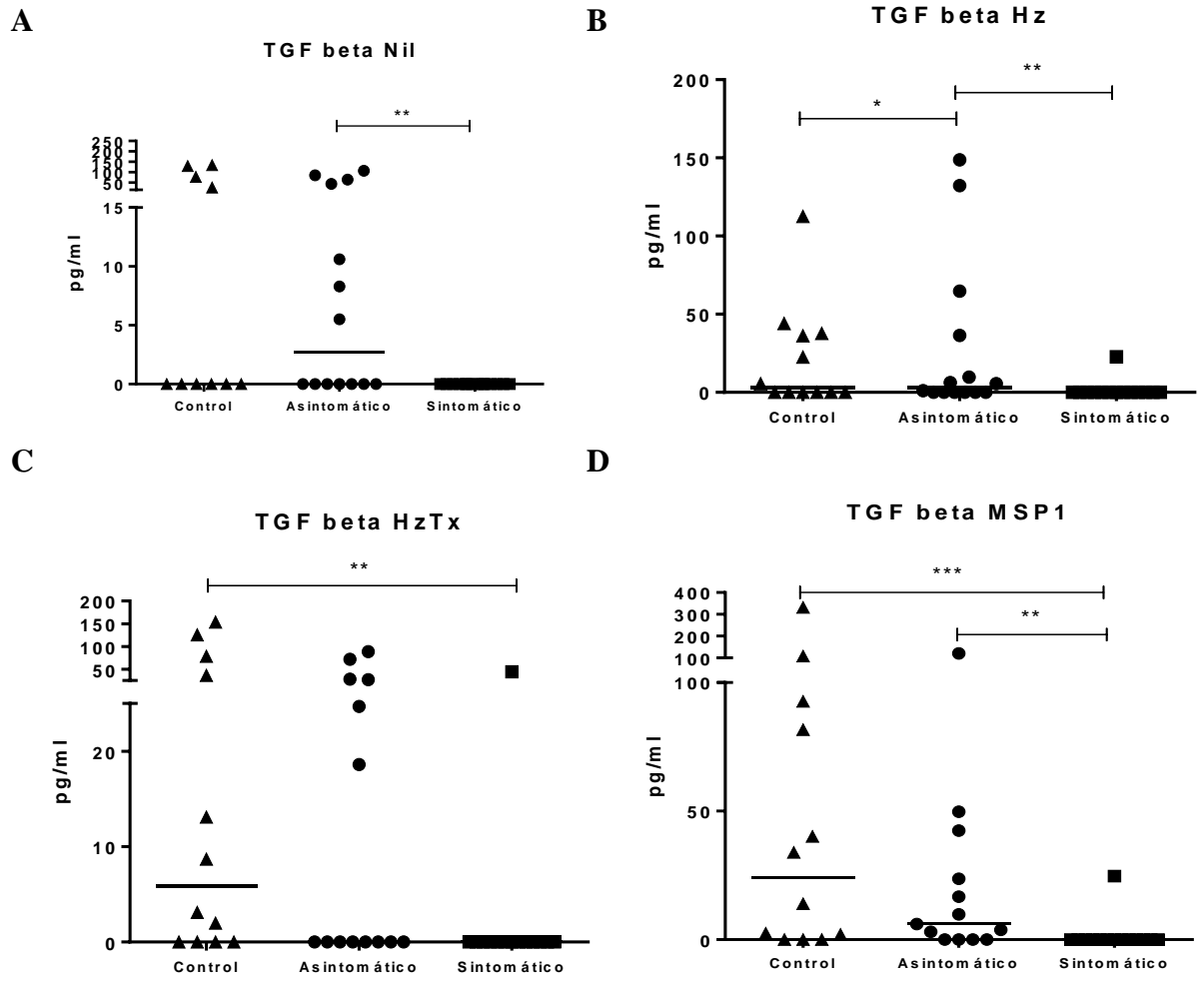


FIGURA 10. Niveles de TGF- β en el sobrenadante de los PBMCs estimulados y no estimulados después de 16 h de incubación de pacientes S e individuos AS y C. (A) Nil, (B) Hz, (C) HzTx y (D) MSP1.

III.3 Activación de la subunidad p65 del factor nuclear kappa B (NFκB) en PBMCs estimulados

Para observar si los diferentes antígenos utilizados en la estimulación *ex-vivo* de los PBMCs de los pacientes S e individuos AS inducen la activación de la subunidad p65 de NFκB en extractos nucleares.

Se observó que la Hz y la HzTx inducen la activación de la subunidad p65 en individuos AS, más no con CpG o MSP1 (Figura 11A).

En los PBMCs de los pacientes S todos los antígenos indujeron el mismo nivel de activación de la subunidad p65 NFκB excepto el CpG (Figura 11B). Estos resultados fueron reproducibles con otros pacientes tanto S como AS.

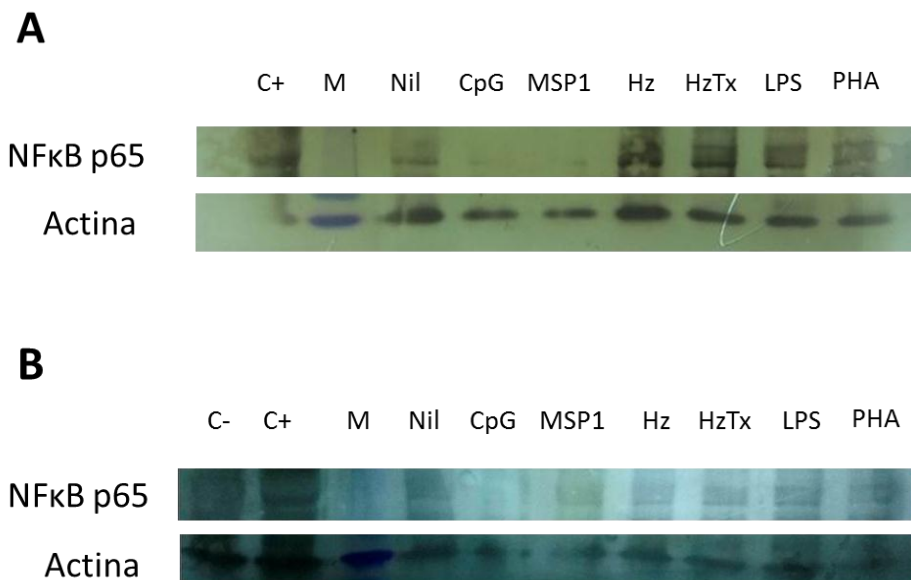


FIGURA 11. Presencia de la subunidad p-65 de NFκB en los PBMCs de individuos AS (A) y pacientes S (B) frente a los diferentes estímulos (Hz, HzTx, CpG y PHA).

IV. DISCUSION

En este estudio, se evaluó la expresión relativa de los genes de citoquinas, su secreción en el sobrenadante y la activación de la subunidad p65 del NFκB en PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con *P. falciparum* y controles sanos de la región Amazónica inducidos con diferentes antígenos de *Plasmodium*: Hz, HzTx y MSP-1 así como con ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4), con la finalidad de obtener el perfil de citoquinas inducidos *ex vivo* por estos antígenos a las 16 horas post-estimulación.

En cuanto a la expresión relativa de los genes *tnf-α*, *ifn-γ*, *il-10* y *tgf-β* en los PBMCs estimulados con los diferentes antígenos, se observó el aumento en la expresión de los genes pro-inflamatorios como *tnf-α* de pacientes S y AS cuando fueron estimulados con HzTx comparado con aquellos estimulados con Hz observando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Figura 2A), y la expresión relativa de *ifn-γ* en S comparado con la expresión en AS estimulados con Hz sin tratamiento (Figura 2B).

La expresión relativa de los genes anti-inflamatorios como *il-10* fue la más elevada, siendo mayor la expresión en células de AS y C estimuladas con HzTx comparados con los S (Figura 3A); asimismo, la expresión relativa de *tgf-β* en PBMCs estimulados con HzTx en S y AS fue mayor comparado con la expresión de este gen en S y AS estimulados con Hz (Figura 3B).

Estos resultados de expresión fueron manifiestos en la producción de las proteínas en los que se observó una respuesta elevada de la proteína IL-10 en el sobrenadante frente a Hz y HzTx en los PBMCs estimulados *ex-vivo* (Figura 6). Asimismo, comparando individualmente la respuesta de los PBMCs de S, AS y C con cada antígeno, se observó que los sujetos AS con la infección de *P. falciparum* produjeron niveles elevados de IL-10 en respuesta al antígeno HzTx, sugiriendo que las células efectoras productoras de IL-10 específicas a HzTx, cumplen un rol importante de la respuesta anti-inflamatoria inducida, resultados que concuerdan con estudios donde mostraron una asociación significativa entre los niveles circulantes de IL-10 y los fagocitos conteniendo Hz en sangre periférica [63].

Por lo tanto, la Hz libre de ADN (HzTx), más no la Hz natural, tiene implicancia en la producción de citoquinas en individuos AS principalmente, como se observa en los resultados de expresión y secreción de citoquinas. Resultados que contrastan con estudios reportados previamente, en los que la Hz natural (sin ningún tratamiento) es la que induce la patofisiología durante la infección con malaria, ya que se ha observado que activa los macrófagos y células dendríticas para la producción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias [53,54]. Así también, se ha observado que la Hz estimula células mononucleares elevando la producción de TNF- α en modelos animales y en humanos [55,56], y ciertas citoquinas anti-inflamatorias y quemoquinas como IL-10 y MIF [54].

Respecto a la naturaleza de la Hz y las discrepancias existentes en cuanto a su función como molécula activadora de la respuesta inmune, podemos postular la hipótesis que si la Hz libre de ADN (HzTx) no es la responsable, por sí misma, de la inducción de citoquinas antiinflamatorias generada en nuestro sistema podríamos deducir que los complejos protéicos (no investigados en este trabajo) adheridos a la Hz estarían activando dicha respuesta como ya se reportó previamente [59]. Es importante realizar estudios adicionales para determinar si esta hipótesis se confirma.

Por otro lado, en este estudio también observamos niveles elevados de las proteínas de IFN- γ e IL-10 en los PBMCs no estimulados de pacientes S comparado con los C y AS (Figuras 8 y 9A), que en términos de concentración (pg/mL), los niveles de IFN- γ son mucho mayores en la mayoría de los S sugiriendo que la respuesta anti-inflamatoria, por medio de IL-10 en estos pacientes, se encendió debido a la fuerte respuesta inflamatoria existente durante la fase aguda de la infección, que se traduce en una respuesta espontánea *ex vivo*. Estos hallazgos van de la mano con los resultados donde los niveles elevados de IL-10, que se producen normalmente durante los estadios tardíos de la respuesta inmune innata frente a *P. falciparum*, parecen proveer un efecto protectoro contra malaria severa previniendo la sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias [64].

Dentro de este contexto, un estudio importante a tomar en cuenta es qué tipo de células T son las productoras de IL-10 durante la infección por *P. falciparum in vivo* o en la inducción con HzTx *ex vivo*, ya que convencionalmente se sabe que IL-10 es una

citoquina Th2, no obstante estudios en malaria sugieren que el rol primario de IL-10 podría ser el de una citoquina inmunoregulatoria [65] y no estaría siendo secretada por un tipo celular T específico sino por los diferentes tipos celulares T de la respuesta inmune adaptativa [30].

Asimismo, la producción de TGF- β en los PBMCs no estimulados de individuos AS resultó ser mayor comparado con los C y S (Figura 10A) sugiriendo que su producción como citoquina también regulatoria es más sostenible espontáneamente en los PBMCs de los individuos AS con valores relativamente bajos. Sugiriendo su importancia en la regulación de los individuos AS con infección por *P. falciparum*.

En la inducción *ex vivo*, la producción de TGF- β en AS comparado con los pacientes S fue estimulada por la Hz natural y la proteína recombinante MSP1₄₂ (Figuras 10B y D respectivamente) con niveles bajos, sugiriendo que estos antígenos de *Plasmodium* son importantes en la inducción de esta citoquina en los PBMCs de AS en nuestro estudio. La proteína MSP1₄₂ ha sido hallada como inductor de la respuesta de IL-10 en PBMCs de adultos asintomáticos de Kenya aunque dicha respuesta es dependiente de la variante alélica y la cepa de donde proviene la proteína recombinante [66], lo que nos indica que para nuestro estudio la característica de la proteína MSP1₄₂, expresada en *Saccharomyces cerevisiae*, tendría implicación en la no inducción de la producción de IL-10 pero sí de TGF- β en los PBMCs estudiados en este capítulo.

Nuestros resultados también mostraron que una vez que los PBMCs de los diferentes grupos de estudio fueron estimulados con los diferentes antígenos, el patrón de producción de citoquinas en S y AS cambió drásticamente.

Específicamente, se observó que los PBMCs estimulados con HzTx inducen IL-10 solo en C y AS, mientras que en S la respuesta cae completamente comparado con los niveles de IL-10 en las células no estimuladas de S, AS y C; por lo que podemos postular la hipótesis que la HzTx no solo resultaría ser un inmunógeno importante durante la estimulación de los PBMCs sino también estaría inmodulando la función de IL-10. Para reforzar esta idea, estudios previos han dado evidencia que la Hz es el mayor componente del parásito que estimula la secreción de niveles altos de IL-10 y altera la respuesta proliferativa de células T [67]. Así también otro estudio concluyó que la Hz puede inducir un cambio de la producción de IFN- γ a la de IL-10 [68].

Por otro lado, también se evaluó la expresión relativa del gen de *tlr9* en nuestro sistema de estimulación *ex vivo* ya que se ha reportado que TLR2 y TLR9 son receptores que median la activación de la respuesta inmune innata a través de las moléculas GPI, la Hz y el ADN derivado de *P. falciparum* [54,56,57] sin embargo, existen discrepancias entre estos hallazgos [54], aunque el reconocimiento inmune de la Hz malarial por el TLR9 ha sido demostrado *in vitro* e *in vivo* [56]. Nuestros resultados revelaron que la expresión del gen de *tlr9* es mayor en pacientes S cuando los PBMCs son estimulados con HzTx y LPS. Asimismo, también se observaron niveles de expresión de *tlr9* en los PBMCs de AS estimulados con CpG y LPS (Figura 4). Sin embargo, estos hallazgos no son resultados concluyentes debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas para determinar si los diferentes antígenos utilizados inducen la expresión de este gen con la finalidad de generar una cascada de respuesta frente a cada estímulo y sería necesario un número mayor de muestras y estudios adicionales en la activación de la señalización que desencadena TLR9 con la Hz y HzTx en S y AS de la Amazonía peruana.

Se ha reportado que el NF- κ B tendría una función regulatoria como factor de transcripción de los genes de citoquinas pro-inflamatorias [69]. En células no estimuladas, el NF- κ B está unido a la proteína inhibidora kappa B (I κ B), que se encuentra en su forma inactiva en el citoplasma. Cuando las células han sido estimuladas, I κ B es fosforilada por la I κ B quinasa y rápidamente degradada en el proteosoma. Subsecuentemente, el dímero activado de NF- κ B se transloca al núcleo, donde se une al sitio regulatorio del ADN para activar la expresión de genes específicos [70]. Aunque se conoce que el incremento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias es un proceso importante que contribuye a la patogénesis de malaria por *P. falciparum*, los mecanismos que involucran la activación del NF κ B en los PBMCs en respuesta a los parásitos de malaria no están completamente entendidos.

En nuestro estudio cualitativo de la activación de la subunidad p65 del NF- κ B en los PBMCs estimulados con CpG, Hz, HzTx, LPSy MSP1 observamos que los individuos AS mostraron que la activación de p65 del NF- κ B se da principalmente con Hz, HzTx y LPS (Figura 11A), mientras que los pacientes S presentan niveles basales de activación (Figura 11B) y esto último se corrobora con los resultados de los niveles de IFN- γ en sobrenadante de los PBMCs cultivados. Esto puede deberse a que las

células T productoras de citoquinas inflamatorias esten disminuidas durante la fase aguda de la enfermedad debido a su migración a otros órganos, como observamos en nuestros resultados con los números de leucocitos y linfocitos disminuidos en S (*Datos suplementarios: Tabla 2*).

La razón por la cual las células de AS responden a la inducción de Hz, HzTx y LPS no queda clara, pero se sugiere que la activación de la subunidad p65 del NF- κ B se este presentando para montar la respuesta proinflamatoria generada inicialmente por TNF- α , citoquina que no pudo ser evaluada a nivel de proteína en el sobrenadante en nuestro estudio por sus niveles fuera de rango (*Datos suplementarios: Tabla 1*) pero si a nivel de expresión de genes. Además, que los monocitos y macrófagos hayan sido activados por estos antígenos [60], debido a que estas células no se encontrarían disminuidas en la circulación por la migración a los órganos linfoides en AS (*Datos suplementarios: Tabla 2*), como las células de los S en fase aguda.

En conclusión, los análisis de expresión de genes y producción de citoquinas en este estudio, en primer lugar, sugieren que la respuesta inmune de las células T específica a inmunógenos del parásito, como HzTx, se induce con facilidad después de la infección por *P. falciparum*. En segundo lugar, queda claro que la inmunogenecidad de la HzTx en términos de estimulación induce una respuesta inmune específica promoviendo la producción de IL-10 e inmunomodulando la respuesta de IFN- γ en S observada en las células no estimuladas.

Es importante resaltar que las limitaciones de este estudio se basan en el número de muestras analizadas, así también, en que las células T productoras de citoquinas específicas a *P. falciparum* de los individuos en fase aguda se encuentran limitadas por su transitoria desaparición de la circulación periférica a los órganos linfoides, por lo que la recomendación general sería estudiar el patrón de citoquinas después que los pacientes hayan eliminado el parásito con el tratamiento, que es cuando estas células re-emergen dentro de la circulación. Asimismo, los tiempos de estimulación *ex vivo* deben ser mayores a 16 horas con la finalidad de observar la producción de citoquinas en el tiempo ya que cada una de ellas tiene un comportamiento característico frente a la infección. Esto daría información valiosa en términos de comparación de la inducción de los PBMCs de S y AS frente a los diferentes inmunógenos del parásito.

CAPITULO 3

Análisis fenotípico y cuantitativo de las células dendríticas (CDs) y células T regulatorias (Tregs) obtenidas de individuos sintomáticos y asintomáticos durante la fase aguda de la infección por *P. falciparum*

I. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune contra los estadios sanguíneos de *Plasmodium* depende fundamentalmente de la respuesta tipo Th1 a través de IFN- γ con una importante coordinación de la respuesta inmune innata y adaptativa a través de las células dendríticas (CDs), células NK, células T “helper” CD4⁺ y células B. Es importante destacar que el equilibrio entre las respuestas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias es esencial para evitar el desarrollo de la patología inmune que conlleva a casos graves como malaria cerebral o anemia severa [33]. Aunque hay diversos avances acerca de la comprensión de los mecanismos beneficiosos y perjudiciales durante la respuesta inmune en malaria, muchos de esos mecanismos siguen siendo de comprensión limitada.

Durante las infecciones agudas con malaria, las CDs capturan glóbulos rojos infectados y productos del parásito, tales como antígenos solubles. Una vez que las CDs reconocen a los antígenos se da la maduración y activación de las mismas, juntamente con la expresión del MHC-II, moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas pro-inflamatorias [21, 71]; así también estas células tienen una capacidad potente para polarizar la diferenciación de las células T CD4⁺ en los subtipos de células Th que incluyen Th1, Th2, Th17, las células Th foliculares y células T regulatorias inducidas [71].

Se ha reportado que las CDs también funcionan como células accesorias y son importantes en la activación de las células NK para citotoxicidad y la secreción de citoquinas en respuesta a virus y tumores. Como resultado de las interacciones con las células T, células NK y otras células efectoras, la capacidad de las CDs para secretar citoquinas es mayor. Por lo tanto, las CDs no sólo son importantes en la presentación de antígenos y la activación de las células T CD4⁺, sino también funcionan como células accesorias para regular y amplificar la respuesta inmune innata y adaptativa [33].

Por otro lado, el rol de las células T CD4⁺ T regulatorias es la de participar en la regulación de la respuesta inmune adaptativa durante la infección por *Plasmodium*. Las células T CD4⁺ Foxp3⁺ se caracterizan por inhibir la respuesta de las células T efectoras durante la infección con la finalidad de evitar el daño tisular, lo que resulta en un inadecuado control del patógeno y la persistencia de bajos niveles de infección [33, 71].

Estudios realizados en humanos y en ratones infectados con *Plasmodium* dan una fuerte evidencia de que los parásitos de *Plasmodium* modulan la maduración y la función de las CDs e inducen la expansión de células T regulatorias CD4⁺ Foxp3⁺ [71]. A su vez, estas células T regulatorias (Tregs) pueden modular las respuestas efectoras de células T CD4⁺ a la infección por malaria suprimiendo la respuesta inmune protectora pero previniendo la patología. Aunque se conoce que el control inmunológico de la multiplicación del parásito es un probable efecto de la función de las CDs que producen IL-12 e inducen la producción de IFN- γ por las células NK y las células CD4⁺ Th1, se ha reportado que algunas CDs tienen un fenotipo tolerogénico y secretan citoquinas tales como IL-2, IL-10, y TGF- β que pueden inducir células Tregs, estos estudios requieren una investigación más profunda. De hecho, se ha observado que las poblaciones de CDs tolerogénicas de humanos y ratones inducen o promueven a las células Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ a través de mecanismos dependientes de TGF- β e IL-2 [33].

En este capítulo examinamos el número y fenotipo de células dendríticas y células T regulatorias en individuos sintomáticos y asintomáticos en fase aguda infectados con *P. falciparum* y su posible papel en la regulación de la inmunidad adaptativa contra los estadios asexuales del parásito.

Objetivos:

1. Evaluar el número absoluto de células dendríticas (mieloides CD11c y plasmacitoides CD123) en PBMCs de individuos sintomáticos o asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum*.
2. Evaluar el número de células T regulatorias (Tregs) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{low} en PBMCs de individuos sintomáticos o asintomáticos con infección aguda de *P. falciparum*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1. MEDICIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (CDs)

Para este estudio, se evaluaron el número de CDs de los PBMCs de pacientes S (n=41), individuos AS (n=22) y C (n=17). Las células dendríticas fueron caracterizadas a partir de un total de 1×10^6 de PBMCs obtenidos utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales murinos: El cóctel linaje 1 (Lin: anticuerpos anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD20 y anti-CD56) conjugado con FITC y el HLA-DR conjugado con PerCP con los que las CDs fueron definidas como $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^+$. Para la caracterización de los subtipos de CDs se utilizaron los anticuerpos anti-CD123 conjugado con PE para la caracterización de células dendríticas plasmacitoides (CDp) y anti-CD11c conjugado con APC para la caracterización de células dendríticas mieloides (CDm) de BD Bioscience.

Se incubó los PBMCs con los anticuerpos monoclonales de CDs durante 30 minutos en oscuridad a 4°C, luego se centrifugó las células a 300 g por 5 minutos utilizando el tampón PBS con 2% de SFB para ser resuspendidas en 300 μL del mismo tampón y quedar listas para la adquisición.

Todas las células fueron adquiridas por citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo ACCURI C6 de dos láser y los resultados fueron analizados utilizando el software ACCURI de BD Biosciences. El número absoluto de CDs fue calculado del número de PBMCs/L de sangre multiplicado por el porcentaje de CDs determinado por el citómetro de flujo.

Para comparar los valores de cada variable, los números absolutos en los diferentes grupos de estudio, se utilizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis. Los niveles de significancia fueron establecidos con un $p < 0.05$ para todos los análisis.

II. 2. COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y MEDICION DE CELULAS T REGULATORIAS (Tregs)

II. 2. 1. Colección de sangre periférica para la medición de células Tregs

Las muestras de sangre total de los pacientes S (n=15), individuos AS (n=11) y C (n=7) fueron colectadas durante el año 2010, en tubos CPT™ heparinizados los cuales contienen un gradiente de separación de células lista para la centrifugación (BD Vacutainer® CPT™, NJ). Los PBMCs se aislaron de la sangre en los tubos CPT mediante centrifugación en el Laboratorio Satélite de Iquitos y fueron enviadas a Lima a temperatura ambiente el mismo día de la toma de muestra dentro de las 8 horas de la extracción de la sangre en el mismo tubo de separación. En Lima se procedió con una centrifugación adicional del plasma que se encontraba en la parte superior del tubo de separación obteniendo los PBMCs para la medición de células Tregs.

II.2.2. Medición de células Tregs por citometría de flujo

Las células Tregs se definieron con el fenotipo CD4⁺, CD25⁺, FoxP3 y CD127^{low}, el porcentaje de estas células se determinó por citometría de flujo. Se utilizaron 1×10^6 de PBMCs por paciente, las células fueron fenotipificadas utilizando primero los anticuerpos monoclonales anti-CD4 conjugado con peridina-clorofila-a (PerCP) y anti-CD25 conjugado con ficoeritrina (PE) de BD Biosciences, San José, California, EE.UU. Después de la fijación y permeabilización de las células, se fenotipificó la proteína FoxP3 intracelular utilizando el anticuerpo monoclonal anti-FoxP3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de eBiosciences, San Diego, California, EE.UU. Las células se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE.UU.). Las células T regulatorias fueron identificadas como células CD25⁺ y FoxP3⁺ de la población celular CD4⁺ en el cuadrante de linfocitos determinado en el citómetro de flujo. El recuento absoluto de células Tregs fue calculado del número de PBMCs/L de sangre multiplicado por el porcentaje de Tregs determinado por el citómetro de flujo. El análisis de resultados de la citometría de flujo se realizó utilizando el software FlowJo (V.8.5 Ashland, Oregon, EE.UU.).

La prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis fue utilizada para comparar los valores de cada variable entre los diferentes grupos. Los niveles de significancia fueron considerados con un valor $p < 0.05$ para todos los análisis.

III. RESULTADOS

III. 1. Número de células dendríticas en PBMCs de individuos S, AS y C en infección aguda con *P. falciparum*

III.1.1 Número absoluto de células dendríticas

En la Tabla 1 y Figura 1 se muestran los resultados correspondientes al número absoluto de células dendríticas en pacientes S e individuos AS con infección aguda por *P. falciparum* e individuos C.

Se observó una disminución del número absoluto de CD totales en pacientes S (15.8×10^6 células/L) comparado a los individuos AS (39.6×10^6 células/L) e individuos C (48.5×10^6 células/L), y la diferencia resultó estadísticamente significativa entre S vs. AS ($p=0.0018$).

Asimismo, se observó una disminución del número absoluto de células mieloides (CD11c) en pacientes S (3.7×10^6 células/L) comparado al número absoluto de CD11c de los individuos AS (19.9×10^6 células/L) e individuos C (30.38×10^6 células/L), con una diferencia estadísticamente significativa entre S vs. AS ($p<0.0001$).

De la misma manera, se observó una disminución de las células plasmacitoides (CD123) en pacientes S (11.5×10^6 células/L) comparado al número absoluto de CD123 de los individuos AS (20.7×10^6 células/L) e individuos C (31.1×10^6 células/L), con una diferencia estadísticamente significativa entre S vs. AS ($p=0.01$).

Estatus clínico de las infecciones con <i>P. falciparum</i>						
Características	Sintomáticos (S)	Asintomáticos (AS)	Controles (C)	Valor P (C vs. S)	Valor P (C vs. AS)	Valor P (S vs. AS)
No. de sujetos	n = 41	n = 22	n=17			
Edad (año) (mediana [rango])	33 [18-63]	31 [18-42]	32 [18-49]	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Género (% hombres)	63.4%	54.5%	64.7%	> 0.05	> 0.05	> 0.05
No. de CD (10 ⁶ /L) (mediana [rango])	15.8 [0-76.7]	39.6 [1.9-90.6]	48.5 [10-88.6]	0.002	0.445	0.0018
No. de CDm (10 ⁹ /L) (mediana [rango])	3.7 [0-34.6]	19.9 [0-52.8]	30.38 [8.2-85.7]	<0.0001	0.028	<0.0001
No. de CDp (10 ⁶ /L) (mediana [rango])	11.5 [0-62.4]	20.7 [0.9-62.5]	31.1 [1.7-80.7]	0.002	0.277	0.01
Parasitemia (no. de parásitos/mL)	2889 [125-69330]	24 [1-3373]	NA	NA	NA	<0.0001

TABLA 1. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de células dendríticas.

Los valores *p* provienen de la prueba Mann–Whitney *U* (para comparar dos grupos no paramétricos). La proporción de hombres fue comparada por la prueba Chi-square.

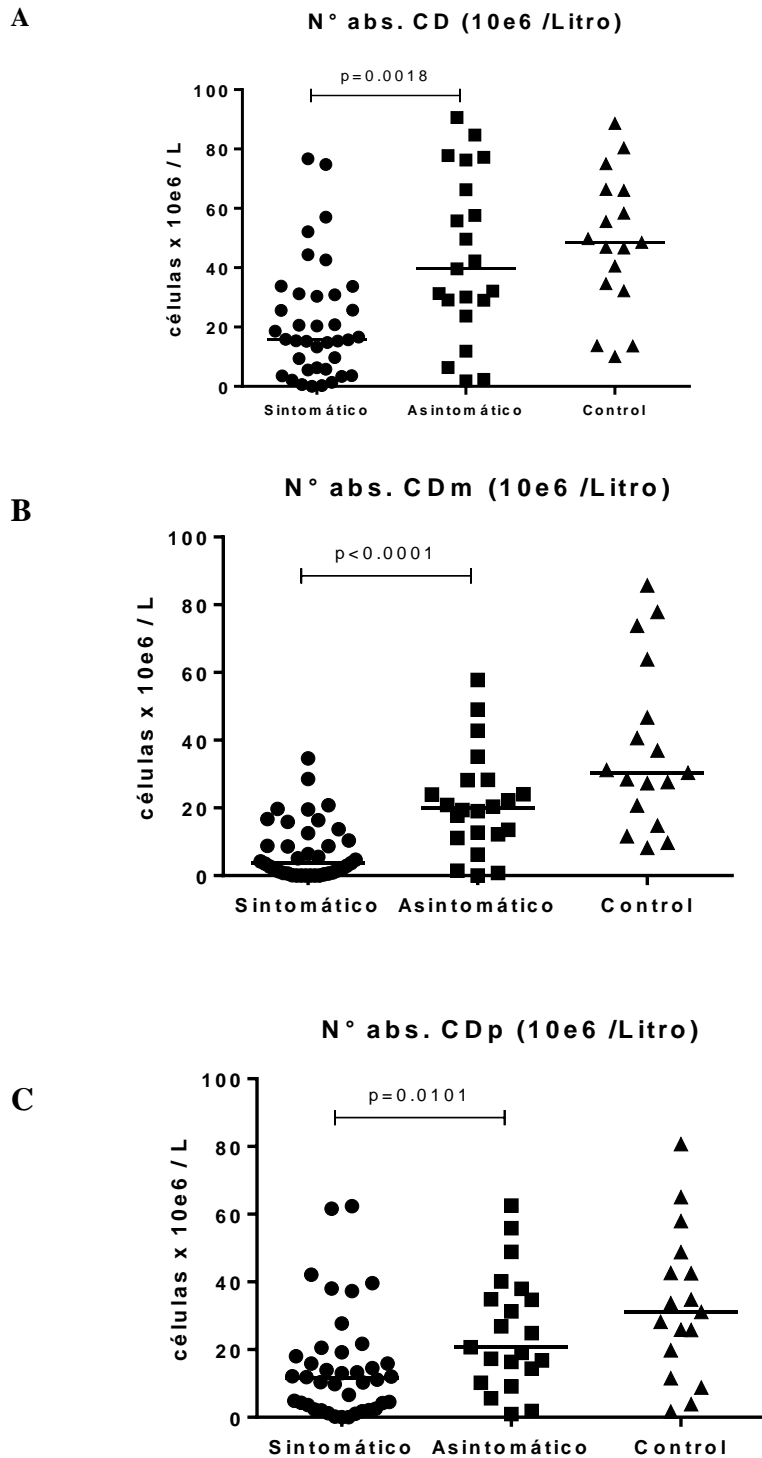


FIGURA 1. (A) Número absoluto de células dendríticas (CD) totales en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum* (B) Número absoluto de CD mieloides (CDm) en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum*. (C) Número absoluto de CD plasmocitoides (CDp) en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum*.

III.1.2 Correlación del número de CD y la parasitemia en pacientes S e individuos AS con infección aguda por *P. falciparum*

En la Figura 2 se muestran los resultados correspondientes a la correlación del número absoluto de CD y los niveles de parasitemia en pacientes S e individuos AS con infección aguda por *P. falciparum*. Donde se observa una ligera correlación negativa entre la parasitemia y el número de CD, a mayor parasitemia menor número de CD.

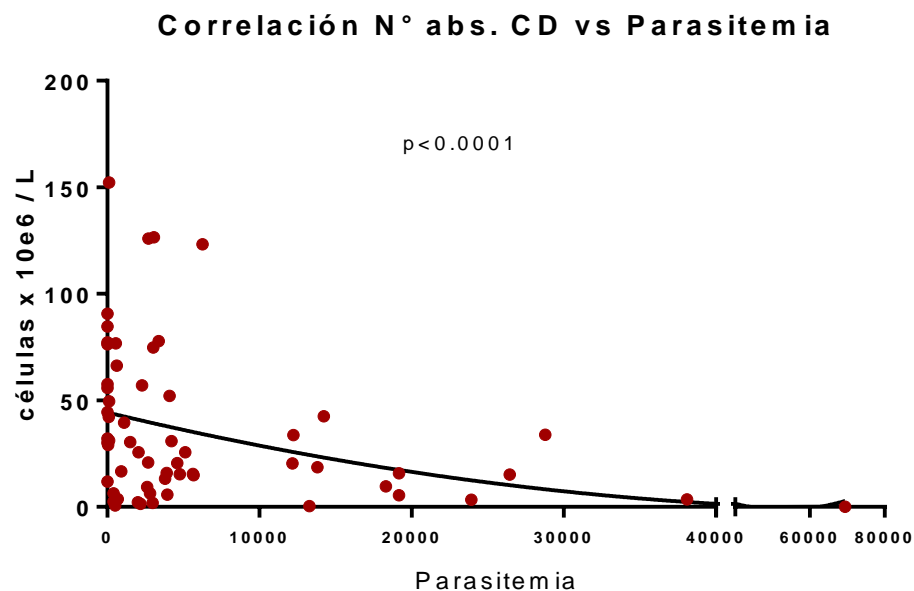


FIGURA 2. Correlación de los números absolutos de las células dendríticas (CD) totales y la parasitemia en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección aguda por *P. falciparum* (cada símbolo rojo representa un paciente).

III. 2. Números de células T regulatorias (Tregs) en infección aguda con *P. falciparum*

En este estudio, se encontró una disminución significativa en el número de linfocitos circulantes en individuos S (Tabla 2, Anexo 1) durante la infección aguda con *P. falciparum*, y podría estar relacionada con la migración de estas células a los ganglios linfáticos durante la infección aguda como se reportó anteriormente [16]. Los individuos AS infectados con *P. falciparum* mostraron un mayor número de leucocitos circulantes en comparación a los individuos S ($5,7 \times 10^9/L$ y $5,0 \times 10^9/L$), respectivamente; $p = 0,002$. Por el contrario, los individuos S mostraron leucocitos totales similares, comparados con los individuos C ($1,41 \times 10^9/L$ y $2,0 \times 10^9/L$), respectivamente; $p = 0,005$. Sin embargo, el recuento total de linfocitos eran similares entre los individuos S y AS ($1,41 \times 10^9/L$ y $1,78 \times 10^9/L$, respectivamente). Los niveles de parasitemia fueron significativamente diferentes entre los individuos S y AS $p = 0,0003$ (Tabla 2, Anexo 1).

Las células Tregs identificadas por citometría de flujo como células T $CD4^+$ expresando $Foxp3^+$, $CD25^+$ y bajos niveles de $CD127^{low}$ fueron medidos y reportados como el porcentaje del total de células T $CD4^+$. No se observó diferencias significativas del porcentaje de células Tregs entre los pacientes S con *P. falciparum* no complicada (mediana 3,9%) y los individuos AS (mediana 3,5%), y C (mediana 3,5%), [$H = 0.613$, $df = 2$, $p = 0,736$], o de números absolutos de células Tregs entre pacientes S e individuos AS (mediana de $7,88 \times 10^6/L$ [3,38 a $24,08 \times 10^6/L$] y la mediana de $8,66 \times 10^6/L$ [5,01 a $16,06 \times 10^6/L$], respectivamente) (Tabla 2, Anexo 1).

Estatus clínico de las infecciones con <i>P. falciparum</i>						
Características	Sintomáticos (S)	Asintomáticos (AS)	Controles (C)	Valor P (C vs. S)	Valor P (C vs. AS)	Valor P (S vs. AS)
No. de sujetos	n = 15	n = 11	n = 7			
Edad (año) (mediana [rango])	28 [9-59]	17 [12-41]	30 [22-34]	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Género (% hombres)	60%	54.55%	71.43%	> 0.05	> 0.05	> 0.05
No. de Leucocitos (10 ⁹ /L) (mediana [rango])	5.0 [4.3-6.0]	5.7 [5.1-7.6]	5.5 [4.2-6.5]	> 0.05	> 0.05	0.0020
No. de Linfocitos (10 ⁹ /L) (mediana [rango])	1.41 [0.93-2.1]	1.78 [1.28-2.58]	2 [1.4-2.6]	0.0054	0.389	0.018
No. de Tregs (10 ⁶ /L) (mediana [rango])	7.88 [3.38-24.08]	8.66 [5.01-16.06]	11.09 [8.88-11.62]	0.29	0.297	0.979
Parasitemia (no. de parásitos ml ⁻¹)	599 [71-52892.31]	1 [1-2874]	NA	NA	NA	0.0003

TABLA 2. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de células T regulatorias.

Los valores *P* provienen de la prueba Mann–Whitney *U* (para comparar dos grupos no paramétricos). La proporción de hombres fue comparada por la prueba Chi-square.

IV. DISCUSION

Teniendo en cuenta que uno de los principales factores determinantes de la inmuno homeostasis es la interacción entre las células Tregs y CDs debido a que las CDs conducen la diferenciación de células T vírgenes a través de la secreción de IFN- γ por las células Th1, e IL-4 por las células Th2, y algunos subconjuntos de células regulatorias que incluyen las Tregs que expresan FoxP3 a través del TGF- β [72]. El presente estudio realizó el análisis independiente del fenotipo y número de las CDs y de las células Tregs los que presentaron diferencias importantes durante la infección aguda con *P. falciparum* en individuos sintomáticos y asintomáticos de la Amazonía Peruana.

Nuestros resultados mostraron una significativa disminución en el número absoluto de CDs totales en S (15.8×10^6 células/L) con infección por *P. falciparum* comparado con los individuos AS (39.6×10^6 células/L) e individuos C (48.5×10^6 células/L) con diferencias estadísticamente significativas entre S vs. AS (Figura 1A). De la misma manera, se muestra una disminución de las CDm (CD11c) y CDp (CD123) en pacientes S (3.7×10^6 células/L y 11.5×10^6 células/L) respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas entre S y AS (Figuras 1B y C).

Esta disminución podría deberse a la interacción directa que hay entre las CDs y los glóbulos rojos infectados en S que causa una sobrevivencia reducida de estas células como ya fue reportado [73]; así también, a la migración incrementada de estas células a los tejidos linfoides durante la infección con *Plasmodium* [74]. La migración de las CDs en humanos es difícil de evaluar directamente; sin embargo, modelos *in vitro* con CDs humanas demostraron que la exposición a los glóbulos rojos parasitados incrementa la expresión de receptores de quemoquinas CCR7 y CXCR4 [75], sugiriendo la migración a los órganos linfoides durante la infección. Algunos estudios también han reportado el incremento en el número de CDs inmaduras [76,77], proponiendo una reducción funcional de CDs y su contribución en la disfunción inmune en malaria [76].

Nuestro estudio también reveló, que los números de CDm (CD11c⁺) y CDp (CD123⁺) son significativamente más elevados en individuos AS comparado con pacientes S (Tabla 1); esto podría estar relacionado con la baja parasitemia en AS lo que

conlleva a una activación reducida de las CD4 y por ende el número de estas células no se ve afectado drásticamente.

Aunque algunos estudios han reportado cambios de las CD4 circulantes en sangre con infecciones por *Plasmodium*, los resultados han sido contradictorios. Niños con malaria severa por *P. falciparum* han reportado incremento en el número de CD4 [78], mientras que adultos con infección de *P. falciparum* han mostrado reducida cantidad de CD4 en malaria no complicada y severa [79]. Adultos con *P. vivax* también mostraron reducidas cantidades de CD4 y CD8 [72,80], estos últimos concuerdan con nuestros resultados en S con infección aguda por *P. falciparum*.

Una de las funciones atribuidas a las CD8 es la promoción de la tolerancia y la regulación de la reactividad inmune [81]. Las CD8 secretan IL-10 que, además de ser una citoquina clave en la inmunoregulación, también determina la longevidad de las CD4 [77]. Adicionalmente, las CD8 (CD123⁺) son también capaces de suprimir la proliferación de células T específicas al antígeno [82]. En modelos murinos con infecciones por *Plasmodium* se ha observado la secreción de IL-10 de las CD8, dos a tres veces más, comparado con las CD4 [83,84].

Por otro lado, investigaciones recientes han demostrado que los niveles circulantes de IL-10 en individuos infectados con *P. falciparum* o *P. vivax* correlacionaron con reducidas frecuencias de CD4 maduras ya que esta citoquina está involucrada en la inducción de la apoptosis de CD4 durante la infección con *P. falciparum* [73, 77]. Estos resultados indicarían que IL-10 puede tener roles variables que utiliza una nueva vía de inmunoregulación durante la infección con *Plasmodium*, por lo que es relevante la medición de citoquinas en suero de pacientes S e individuos AS en nuestro estudio con la finalidad de observar la función de IL-10 en las células dendríticas de estos pacientes.

Las células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{low} en los pacientes S, individuos AS y C de la Amazonía Peruana mostraron números absolutos similares de células Tregs en sangre periférica (Tabla 2, Anexo 1). Asimismo, no se observó correlación entre el número de células Tregs y la parasitemia sugiriendo que la relación entre la parasitemia y la expansión de las Tregs no está definida claramente en este estudio. Nuestros resultados podrían coincidir con un estudio llevado a cabo en Fulani, un grupo

étnico del Oeste de África con baja susceptibilidad a malaria, en el que se reportó que PBMCs de individuos de esta población expresan altas cantidades de ARN para varios genes de citoquinas Th1 y Th2 pero la expresión de genes *foxp3* y el antígeno de linfocito T citotóxico 4 (*ctla4*) presentaron niveles marcadamente bajos [85]. Sugiriendo que no hay una respuesta regulatoria llevada a cabo por las Tregs *per se* sino más bien una respuesta Th1 y Th2 más eficiente contra los antígenos de *P. falciparum* [86].

Nuestros resultados contrastarían con estudios previos en ratones y humanos en otras regiones endémicas a malaria [69,87,88], donde la expansión de las células Tregs esta asociada significativamente con el incremento de la carga parasitaria y el desarrollo de la malaria clínica.

Otros estudios han comparado el número de células Tregs con malaria severa o no complicada, encontrando un incremento en el número de Tregs durante la convalecencia y estuvo negativamente asociado con la magnitud de la respuesta de memoria Th1 en niños [89], y el incremento asociado con la biomasa del parásito en casos de malaria severa más no en casos no complicados en adultos [90]. En adultos con infecciones de *P. vivax* no complicada se encontraron proporciones incrementadas de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en Tailandia [70] y Brasil [91].

Contrariamente, se ha observado que los pacientes con malaria de zonas hipoendémicas a mesoendémicas mostraron bajos niveles de números absolutos de células Tregs comparado con los controles, los que estuvieron relacionados a la disminución en el conteo de células T CD4⁺. En contraste a nuestras observaciones, este estudio mostró que el conteo de Tregs CD25⁺Foxp3⁺ fueron inversamente proporcionales al nivel de parasitemia [72,80].

Con los resultados de este estudio, concluimos que durante la fase aguda de malaria en pacientes S y AS de la Amazonía Peruana infectados con *P. falciparum* se observan cambios en los números absolutos de las poblaciones circulantes de CDs que estarían activando a las células T efectoras para la reducción de la parasitemia y que esta activación no involucraría necesariamente la expansión clonal de las células Tregs que pueden afectar el desarrollo de la inmunidad protectora ya en progreso, por lo tanto se postula la hipótesis que las citoquinas regulatorias, más no las células Tregs *per se*, tendrían mayor relevancia en la regulación de la enfermedad en esta población.

Finalmente, es importante realizar experimentos adicionales con un número mayor de muestras. Explorar otros parámetros no solo los cuantitativos sino también los cualitativos y funcionales; esto es estudiar el nivel de diferenciación/maduración de las CDs así como realizar la medición de citoquinas como IL-10, TGF- β en plasma o suero con la finalidad de establecer resultados concretos no solo en el número de CDs y células Tregs sino también en la función de interacción en la respuesta inmune adaptativa de estas células durante la infección con *P. falciparum* en sujetos sintomáticos y asintomáticos de nuestra región. Por otro lado, un estudio más exhaustivo de las CDs y células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ de estos individuos pertenecientes a una zona hipoendémica pueden proporcionar conocimiento del equilibrio entre las respuestas de iniciación de la protección y regulación en favor del hospedero y la adquisición de la inmunidad clínica.

CAPITULO 4

Identificación de proteínas altamente reactivas al suero de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con *P. falciparum* en la Amazonia Peruana utilizando microarreglos de proteínas

I. INTRODUCCIÓN

El dogma en el campo de la malaria sostiene que la adquisición de la inmunidad clínica de la malaria por *Plasmodium falciparum* resulta de la interacción de dos factores. Específicamente, la producción de anticuerpos específicos a antígenos [92,93] y exposiciones repetidas al parásito durante las estaciones de transmisión son importantes para el inicio de la respuesta inmune clínicamente protectora manifestada por la parasitemia asintomática [93], también llamado premonición [94]. Estos patrones han sido característicos de las regiones de alta transmisión a malaria, principalmente en África subsahariana [93, 84].

Estudios previos realizados en Mali, en los que utilizaron sistemas de microarreglos de proteínas en inmunología han dado a conocer la respuesta inmune específica frente al antígeno mediante el análisis de los sueros de los habitantes de las regiones endémicas a *P. falciparum* [84]. Estos datos han sido interpretados dentro del concepto de que el desarrollo de la inmunidad adquirida depende de la edad y la exposición a múltiples infecciones, en la medida que la edad puede considerarse un sustituto de inmunidad clínica en zonas donde las infecciones con malaria son comunes e intensas durante la época de lluvias [84].

Sin embargo, las infecciones asintomáticas de malaria son comunes en la Amazonía tanto brasilera como peruana, donde la transmisión es considerada hipoendémica y de baja intensidad [9, 95-96]. Es importante destacar que de acuerdo a diferentes estudios sobre la parasitemia asintomática en la Amazonía se ha inferido que la inmunidad clínica se puede desarrollar con más rapidez en zonas de baja transmisión [9,95-96], que está en contraste con regiones de alta transmisión, donde la inmunidad adquirida se manifiesta por una intensa y continua transmisión a través de los años para que finalmente se desarrolle la parasitemia asintomática [92, 84]. Estas observaciones implican que los mecanismos inmunológicos relacionados a la adquisición de la inmunidad clínica en áreas con alta transmisión son diferentes a aquellos que ocurren en zonas de baja transmisión, un área importante a ser explorada en nuestra región endémica.

En la región amazónica, las parasitemias asintomáticas de malaria son comunes y los casos no son detectados pasivamente mediante la vigilancia normal, que esta basada en el método donde las personas con síntomas acuden a un establecimiento de salud buscando un diagnóstico [96, 19]. Además, individuos clínicamente inmunes probablemente sean reservorios del parásito y responsables de la transmisión de la malaria, y por ello, la comprensión de los mecanismos inmunológicos adquiridos pueden conducir hacia el desarrollo de nuevas estrategias de vacuna contra la malaria. En este contexto, hay evidencia de que los mecanismos dependientes de los anticuerpos desempeñan un papel importante en la reducción de la parasitemia y pueden disminuir los síntomas clínicos en seres humanos, como se demostró por la transferencia pasiva de inmunoglobulina G hiperinmune (IgG) [92].

En este capítulo, se utilizaron microarreglos de proteínas a escala genómica con la finalidad de analizar las respuesta de IgG frente a más de 800 proteínas recombinantes del estadio asexual de *P. falciparum* en sujetos de la Amazonía peruana infectados con est especie del parásito. La hipótesis planteada es que los sujetos asintomáticos con parasitemias de *P. falciparum* reconocen diferencialmente un subconjunto de proteínas de *P. falciparum* y esto se se debe, probablemente, a un mayor número de infecciones previas de estos individuos, en comparación con los pacientes sintomáticos, lo que implica una contribución de éstas proteínas a la respuesta inmune protectora.

Objetivos:

1. Comparar las respuestas de anticuerpos IgG totales en individuos sintomáticos y asintomáticos con la finalidad de determinar el reconocimiento diferencial de proteínas en estos 2 grupos de sujetos con malaria en fase aguda.
2. Identificar los antígenos más inmunodominantes compartidos por individuos sintomáticos y asintomáticos con la finalidad de identificar nuevos posibles antígenos candidatos para la vigilancia seroepidemiológica.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 NUMERO DE PACIENTES ESTUDIADOS

Para este estudio, un total de 38 muestras de sueros o plasmas de individuos infectados con *P. falciparum*, colectadas durante los años 2008-2012, fueron evaluadas utilizando microarreglos de proteínas. El enrolamiento de pacientes, la procedencia y procedimiento de obtención de las muestras de estudio se relatan en las páginas 24-25 (CAPÍTULO 1 Figura 5). Los sueros o plasmas de 24 pacientes S (10 mujeres y 14 hombres; 30 años promedio; rango, 9–59 años) y 14 individuos AS (3 mujeres y 11 hombres; de 31 años promedio; rango, 12–52 años), fueron evaluados en los microarreglos de proteínas de *P. falciparum* comercialmente disponibles y desarrolladas por *Antigen Discovery* en Irvine, California.

II. 2 RESPUESTA IgG POR MICROARREGLOS DE PROTEÍNAS

Brevemente, este estudio utilizó microarreglos seleccionados basados en la identificación de antígenos seroreactivos de estudios previos correspondientes al 60% del proteoma de *P. falciparum* aproximadamente (P. Felgner, datos no publicados). Los microarreglos seleccionados en este estudio se denominaron “Pf824” y fueron diseñados para tener 824 productos de exones diferentes de *P. falciparum* correspondiente a 699 genes diferentes de *P. falciparum* [84]. Los resultados reportados fueron obtenidos de las sondas de microarreglos que fueron revelados con un escaner confocal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú; los datos obtenidos fueron analizados en la Universidad de California Irvine.

La detección de la señal estuvo basada en el anticuerpo secundario biotinilado (IgG Fcy anti-humano conjugado con biotina producido en cabras) y la detección terciaria fluorescente (Alexa Fluor conjugado con estreptavidina) en un pre-bloqueo con lisados de *E. coli* 1% en la solución tampón de bloqueo. Las láminas fueron leídas en un escaner de laser confocal GenePix 4200A y la intensidad fluorescente fue analizada utilizando el software *Pro ScanArray Express*.

Los valores de cada señal detectada en los microarreglos escaneados fueron

normalizados con la prueba t Bayesiano utilizado para identificar la respuesta diferencial. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba R (<http://www.r-project.org>). La prueba t Bayesiana regularizada y adaptada de Cyber-T para microarreglos de proteínas [100] fue utilizada para comparar la reactividad a los antígenos entre los grupos de sintomáticos y asintomáticos; el método Benjamini-Hochberg fue utilizado para corregir las mediciones múltiples, estimar la tasa de falsos positivos y dar valores P corregidos. Las proteínas con valores de señal transformados >2 desviaciones estándar sobre el promedio del control negativo fueron considerados reactivos.

III. RESULTADOS

III. 1. Evaluación de la respuesta IgG en un panel de proteínas de *P. falciparum* por microarreglos de proteínas

El análisis de edad, género y número de episodios de malaria con *P. falciparum* y *P. vivax* en los pacientes S e individuos AS infectados con *P. falciparum* fueron comparables en este estudio (Table 1, Anexo 2). Todos los individuos S reportaron al menos una infección diagnosticada con *P. falciparum* (mediana, 2 infecciones [1–4 infecciones]) y 3 infecciones para los individuos AS [rango, 1–4 infecciones]; $P = 0.011$; (Table 1, Anexo 2).

Se observaron niveles de parasitemia elevados en los pacientes S (7,325 parásitos/ μ L; [71-39,778]) comparado a los individuos AS (526 parásitos/ μ L; [24-12,915]) con una significancia estadística ($p < 0.001$). La mayoría de los participantes fueron hombres los cuales trabajaban lejos de sus casas por más de 7 días.

Los sueros analizados de los pacientes S e individuos AS con infección aguda de *P. falciparum* fueron evaluados por microarreglos de proteínas con antígenos de los estadios asexuales de *P. falciparum* para evaluar la respuesta IgG totales. Cincuenta y dos antígenos de 51 proteínas (PfMSP1 fue dividido en dos segmentos) fueron diferencialmente reactivos entre las muestras de los dos grupos de pacientes ($p \leq 0.05$) (Figura 1). De estos antígenos, 13 fueron identificadas como proteínas conservadas de *Plasmodium* con función desconocida. PfMSP1 (identificación del gen como PFI1475w), establecido como una proteína candidato a vacuna, mostró la más alta reactividad entre los antígenos diferencialmente reactivos. Otras proteínas candidatos a vacunas encontradas en nuestro estudio fueron EBA175 (MAL7P1.176) y el antígeno del estadio del hígado 3 (PFB0915w). El antígeno de superficie del estadio de anillo del (PFA0110) también fue diferencialmente reactivo; se ha reportado que esta proteína está involucrada en la modificación de las propiedades biofísicas de los eritrocitos infectados, y su efecto se incrementa y esta asociado con fiebre [101, 102]. Asimismo, dos proteínas de choque calórico, HSP40 (PFE0055ce4) y HSP70 (MAL7P1.228), también fueron reconocidas diferencialmente. Muchas otras proteínas están involucradas en la interacción entre los glóbulos rojos infectados, los no

infectados y células endoteliales.

Por otro lado, un total de 535 proteínas fueron significativamente reactivas en ambos grupos de estudio: 522 fueron identificadas en el suero de los sujetos AS y 471 en el suero de sujetos S. La suma total de reactividad de IgG en relación a la parasitemia fue más elevada en AS comparado con los sujetos S. Aunque la reactividad fue más elevada en los individuos AS, un panel de 5 proteínas fue más reactivo para ambas condiciones clínicas, indicando la utilidad potencial de estas proteínas en estudios seroepidemiológicos. Este panel incluyen a la proteína exo-antígeno PF70 (PF10_0025), único en *P. falciparum*; 2 proteínas conservadas de función desconocida (PF070053 y PFA0410), MSP10 10 (PFF0995c), y el factor de transcripción putativo (PF100075) con dominios encontrados en el género apicomplexa (Figura 2, Anexo 2).

Estatus clínico de la infecciones con *P. falciparum*

Características	Sintomáticos (S)	Asintomáticos (AS)	Valor <i>P</i>
No. de sujetos	n = 24	n = 14	
Mediana edad (años) [rango]	27 [9—59]	32[12-52]	0.868
Género (% male)	58%	79%	0.205
No. episodios of malaria-vida (mediana[rango])	3 [1—8]	4 [2—7]	0.505
No. episodios con <i>P. falciparum</i>	2 [1—4]	3 [1—4]	0.011
No. episodios con <i>P. vivax</i>	2 [0—5]	1.5 [0—4]	0.325
Parasitemia (no. de parásitos ml/L)	7325 [71—39778]	526 [24—12915]	<0.001

TABLA 1. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de microarreglos de proteínas.

Las variables continuas y binomiales fueron comparados entre sintomaticos y asintomaticos utilizando la prueba *Mann-Whitney U* y la prueba chi-square, respectivamente.

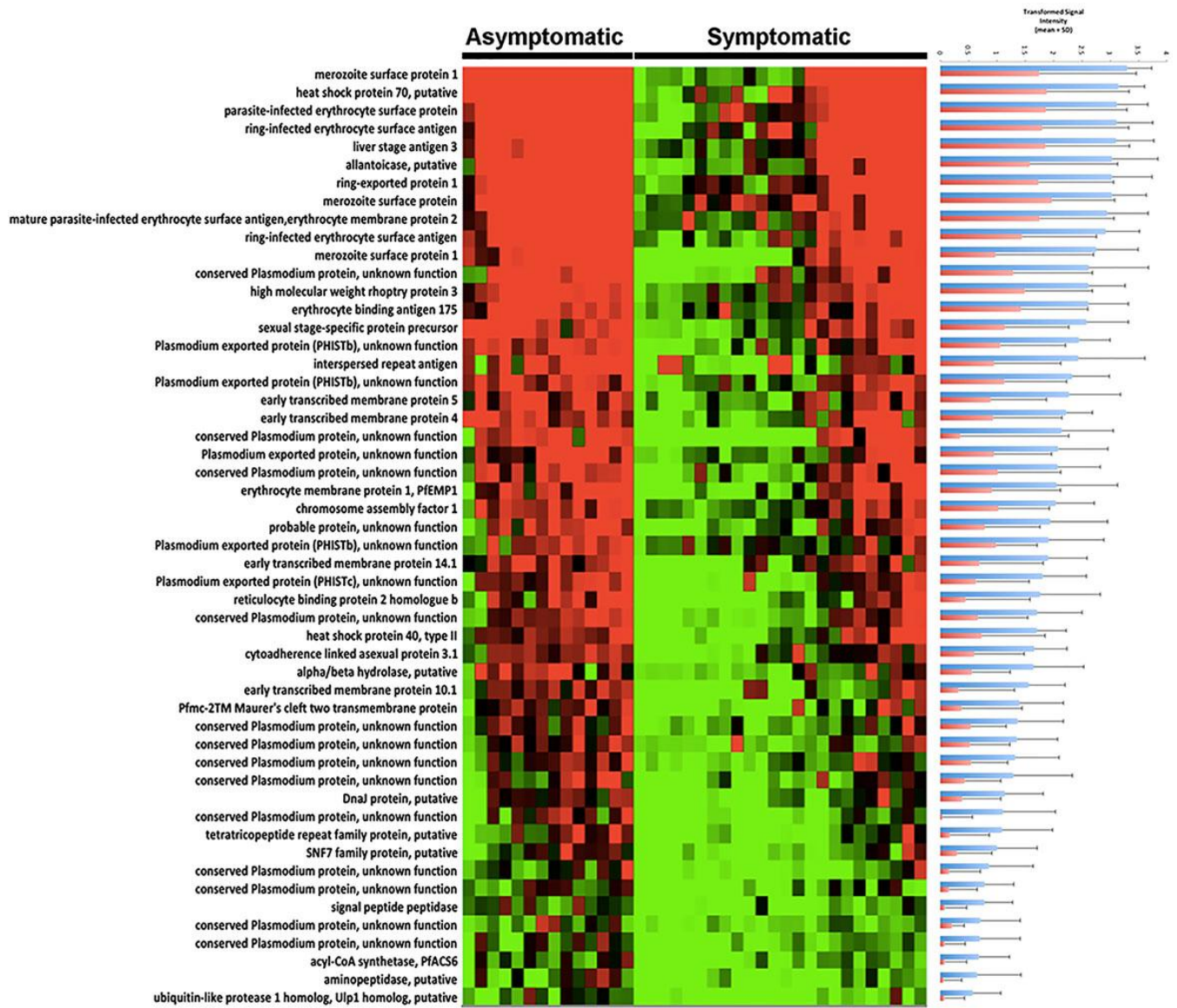


FIGURA 1. Antígenos de *P. falciparum* reactivos diferencialmente entre sujetos AS y S. El color rojo indica la intensidad de señal más alta. A la derecha, se muestran los valores transformados en varianza para los sujetos AS (barra azul) y sujetos S (barra roja), mostrando la intensidad de señal diferentes cuantitativamente. El “heat map” fue hecho utilizando el Multi-Experiment Viewer (MEV) 4.8.

Por otro lado, se comparó la diversidad genética (π) de los polimorfismos no sinónimos de los genes que codifican el conjunto de antígenos de *P. falciparum* reconocidos diferencialmente con las secuencias codantes de todo el genoma de *P. falciparum* (Tabla 2). Los genes que codifican el conjunto de antígenos diferencialmente reconocidos tuvieron un mayor nivel de diversidad polimórfica no sinónima comparado con el resto de los genes codantes (media, $2,6 \times 10^{-3}$ vs $7,9 \times 10^{-4}$; Mann-Whitney U, $W = 117\ 271$, $P = 8,05 \times 10^{-5}$) [103]. Estas observaciones sugieren que existe selección positiva por parte del sistema inmune en estos antígenos.

LOCUS	CODIGO	piN	piS	piN/piS
PF3D7_0102200	PFA0110w	0.001515608	0.002313864	0.655011615
PF3D7_0202400	PFB0115w	0.00069447	0.000656881	1.057223467
PF3D7_0220000	PFB0915w	0.003143646	0.004420504	0.711150975
PF3D7_0301900	PFC0095c	0.000676163	0.002197125	0.307748959
PF3D7_0302500	PFC0120w	0.007704959	0.027030855	0.285043101
PF3D7_0316500	PFC0720w	4.00E-05	0	ND ^a
PF3D7_0401900	PFD0085c	0.002711623	0.001314006	2.063630592
PF3D7_0406200	PFD0310w	0.000126178	0	ND ^a
PF3D7_0423700	PFD1120c	0.00242942	0	ND ^a
PF3D7_0424800	PFD1180w	0.0004852	0.000379997	1.276850879

TABLA 2. Ratios de los genes codantes de las proteínas de *P. falciparum* reconocidas diferencialmente (piN/piS*).

^aNo determinado (ND), porque el gen no presenta variantes no sinónimas de un nucleótido.

*piN/piS indica el ratio de polimorfismos no sinónimos/sinónimos.

IV. DISCUSIÓN

Con la finalidad de analizar la respuesta de anticuerpos naturalmente adquirida contra un panel de proteínas de los estadios asexuales de *P. falciparum*, se utilizaron microarreglos de proteínas a escala genómica.

En este estudio, encontramos que los sujetos asintomáticos infectados con *P. falciparum* tuvieron una respuesta de anticuerpos elevada, que diferencialmente reconocieron 51 antígenos de proteínas de este parásito de un panel de 824 proteínas previamente determinadas y globalmente reconocidas por su reactividad en la respuesta IgG humana [84]. Esta conclusión, esta fuertemente apoyada en el hecho de que los genes codifican diferencialmente antígenos reactivos, evidencia demostrada de la selección inmune a una escala genómica (Anexo 2).

En estudios previos, se identificaron antígenos inmunogénicos los que incluyen proteínas candidatas a vacunas como MSP1, encontrando una alta reactividad utilizando otras metodologías de estudio [97]. Asimismo, nuestro estudio reveló nuevas proteínas no reconocidas o estudiadas previamente, que demostraron alta reactividad diferencial en nuestra población (Figura 1, Anexo 2), sugiriendo que la inmunidad protectora contra los parásitos de malaria, sin importar el estadio, es compleja y dependiente de la respuesta inmune simultanea contra un panel grande de antígenos de *P. falciparum*, como previamente fue descrito en inmunidad protectora anti-esporozoito [104]. Estos nuevos antígenos de *P. falciparum* identificados podrían ser útiles en intervenciones seroepidemiológicas a gran escala en regiones de transmisión de malaria.

Este estudio en microarreglos de proteínas es el primero en desplegar un sistema de alto rendimiento y útil en la identificación de proteínas como posibles blancos de la inmunidad protectora y en la identificación de estas proteínas como marcadores potenciales de estudios seroepidemiológicos con la finalidad de identificar patrones de transmisión de malaria en esta región hipoendémica de la Amazonía Peruana. Los datos sugieren que la inmunidad clínica ocurre naturalmente y la respuesta estaría dirigida por un grupo grande de antígenos claves

diferencialmente reconocidos por los individuos AS comparado a los S.

En la Amazonía Peruana, utilizando aproximaciones clásicas se reportó una respuesta IgG conduntende contra MSP1-19 y ésta fue suficiente para producir una respuesta IgG positiva anti-MSP1-19 por más de 5 meses [99,105]. Estos datos fueron interpretados como indicativos de inmunidad protectora. Un reporte reciente proveyó una fuerte evidencia de que la población expuesta en regiones de baja transmisión tienen una capacidad de desarrollar inmunidad clínica (manifestado con bajos niveles de parásitos y la ausencia de síntomas típicos de malaria) que esta igualmente asociada, al menos en parte, con una respuesta de anticuerpos a ligandos de invasión como EBL (EBA-175, EBA-181, EBA-140) Y pfrh definidos para *P. falciparum* [39].

Debido a algunas limitaciones, este estudio debe ser replicado en las diferentes regiones donde la malaria es endémica y con un tamaño muestral mayor. Con esto probablemente aumente la variedad de antígenos implicados en la respuesta que conduce al desarrollo de la inmunidad clínica. Sin embargo, el análisis estadístico riguroso utilizado en este estudio, identificó un conjunto de 51 antígenos de proteínas diferencialmente reactivos asociados con el estado de AS, mientras que un número más grande de muestras probablemente identifique otras proteínas que sean diferencialmente reactivas entre S y AS sin desmerecer los resultados de este estudio.

Además, el hallazgo independiente de que los genes que codificaron antígenos diferencialmente reactivos contenían mutaciones no sinónimas comparándolo con el genoma en conjunto, sugiere firmemente que estos antígenos generan la respuesta inmune protectora debido a la selección inmune de aminoácidos polimórficos en este conjunto de proteínas.

Una desventaja preocupante fue que los microarreglos de proteínas comprenden proteínas recombinantes provenientes de un sistema de expresión en *E. coli* donde la conformación y el plegamiento de la proteína puede no expresarse de

manera correcta. No obstante, los resultados de la reactividad de los anticuerpos en este estudio revelaron que hay una correlación sólida entre la reactividad de los IgG y las proteínas expresadas en este sistema que correspondería a un correcto plegamiento de las proteínas desplegadas en estos microarreglos, como se demostró anteriormente [84,104]

Por otro lado, la proteína MSP10 de *P. falciparum*, que contiene características estructurales parecidas a otras proteínas del merozoito (como MSP1 y MSP8), además de no haber sido estudiada previamente y no esta relacionada con inmunidad clínica, fue identificado como proteína altamente reactiva tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos. Por lo tanto, nuestros resultados con MSP10 sugieren que esta proteína podría ser un buen marcador en estudios seroepidemiológicos para identificar poblaciones en los la malaria es transmitida. Resultados similares fueron hallados con *P. vivax* en la Amazonía peruana [106].

Un aspecto clave en este estudio es que se definió cuidadosamente la parasitemia asintomática así como la inmunidad clínica de los individuos en nuestra población de estudio, en lugar de utilizar la edad como indicador de inmunidad clínica como lo reportan otros estudios y de esta manera se comparó la respuesta IgG mediante microarreglos de proteínas [84]. Un punto importante a considerar, a partir de los datos presentados en este estudio, es que la densidad parasitaria como un predictor de la falta de síntomas podría ser considerado como un potencial confusor. Desde hace tiempo se sabe que bajas parasitemias se asocian con la falta de fiebre relacionada con la malaria en áreas holoendémicas. Los datos presentados aquí apoyan la hipótesis de que un perfil de anticuerpos específicos presentados en el análisis de microarreglos de proteínas podría predecir la falta de síntomas y por ende el estatus de inmunidad clínica. Sería ideal comparar la respuesta de anticuerpos a nivel genómico en pacientes sintomáticos y asintomáticos que presenten altas parasitemias.

Por otro lado, con la ventaja de haber identificado proteínas inmunodominantes reconocidas por pacientes S e individuos AS individualmente, se sugiere que estas

proteínas podrían ser útiles como nuevos marcadores para diferenciar AS de S. La conclusión de estos y otros resultados sería que la protección a la infección y a los síntomas proviene de la reacción a un amplio panel de proteínas, un hecho que podría ir en contra de las estrategias actuales en la búsqueda de vacunas enfocadas en una sola proteína (Anexo 2).

CAPITULO 5

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El objetivo general de esta tesis fue explorar la respuesta inmunológica celular y humoral de individuos sintomáticos y asintomáticos con infección por *P. falciparum* provenientes de la Amazonía peruana en dos sistemas de evaluación *ex vivo* e *in vivo*.

En el capítulo 2, se evaluó la expresión relativa de los genes de citoquinas, su secreción en el sobrenadante y la activación de la subunidad p65 del NFκB en PBMCs de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con *P. falciparum* y controles sanos de la región Amazónica inducidos con diferentes antígenos de *Plasmodium*: Hz, HzTx y MSP-1 así como de ligandos de TLRs: CpG (TLR9) y LPS (TLR4), con la finalidad de obtener el perfil de citoquinas *ex-vivo* inducidos por estos antígenos a las 16 horas post-estimulación.

En este capítulo se resaltó que los sujetos AS con la infección aguda de *P. falciparum* produjeron niveles elevados de IL-10 en respuesta al antígeno HzTx, sugiriendo que las células efectoras productoras de IL-10 específicas a HzTx cumplen un rol importante controlando la cascada de la respuesta inflamatoria en estos individuos. Con esto, la Hz libre de ADN (HzTx) sería un inmunogeno importante en los individuos AS principalmente, resultados que discrepan con otros estudios en los que la Hz natural es la que tiene implicancia en la inducción de citoquinas [53-56]. Por lo tanto, quedaría en discusión la implicancia de la Hz libre de ADN (HzTx) u otras moléculas adheridos a este cristal responsables de la inducción de citoquinas.

Además, se observó que los PBMCs estimulados con HzTx inducen IL-10 solo en C y AS, mientras que en S la respuesta cae completamente comparado con los niveles de IL-10 en las células no estimuladas de S, AS y C; por lo que podemos postular la idea que la HzTx no solo resultaría ser un inmunógeno importante durante la

estimulación de los PBMCs sino también estaría inmodulando la respuesta de IL-10 datos que se pueden reforzar con estudios pero donde utilizan Hz natural que estimula la secreción de niveles altos de IL-10 y altera la respuesta proliferativa de células T [67].

La producción de TGF- β en los PBMCs no estimulados de individuos AS resultó ser mayor comparado con los C y S sugiriendo que su producción como citoquina también regulatoria es más sostenible espontáneamente en los PBMCs de los individuos AS. Asimismo en el caso de esta citoquina, la HzTx no genera una inducción significativa comparandolo entre grupos, siendo la Hz natural y la proteína recombinante MSP1₄₂ los que inducen la respuesta de esta citoquina en PBMCs de AS.

La activación de p65 del NF- κ B en los individuos AS se dió principalmente con Hz, HzTx y LPS lo que podría estar relacionado a la activación de esta subunidad por los monocitos y macrófagos que no se encuentran disminuidos en estos pacientes. Mientras que los pacientes S presentan niveles basales de activación y esto último se corrobora con los resultados de los niveles de la proteína IFN- γ en sobrenadante. Esto podría deberse a que las células T productoras de citoquinas inflamatorias esten disminuidas durante la fase aguda de la enfermedad debido a la migración a otros órganos como observamos en nuestros resultados de número de leucocitos y linfocitos en S (*Datos suplementarios: Tabla 2*)

Teniendo en cuenta que uno de los principales factores determinantes de la inmuno homeostasis en malaria es la interacción entre las células Tregs y CDs *in vivo*, en el capítulo 3, los resultados nos indican que durante la fase aguda de malaria en pacientes S y AS de la Amazonía Peruana infectados con *P. falciparum* se observan cambios en los números absolutos de las poblaciones circulantes de CDs que estarían activando a las células T efectoras para la reducción de la parasitemia y que esta activación no involucraría necesariamente la expansión clonal de las células Tregs que pueden afectar el desarrollo de la inmunidad protectora ya en progreso, por lo que se postula la hipótesis que las citoquinas regulatorias, más no las células T regs

per se, tendrían mayor relevancia en la regulación de la enfermedad en esta población.

En el último capítulo experimental (capítulo 4), se utilizaron microarreglos de proteínas a escala genómica con la finalidad de evaluar la reactividad de anticuerpos IgG frente a más de 800 proteínas recombinantes del estadio asexual de *P. falciparum* en sujetos con diferente estatus clínico (sintomáticos y asintomáticos) de la Amazonía peruana infectados con esta especie del parásito. Encontramos que los sujetos asintomáticos presentaron una respuesta de anticuerpos contundente, reconociendo diferencialmente 51 antígenos de proteínas de este parásito de un panel de 824 proteínas previamente determinadas y globalmente reconocidas por su reactividad con la respuesta IgG humana [84]. Se identificaron antígenos inmunogénicos los que incluyen proteínas candidatas a vacunas como MSP1 así como nuevas proteínas no reconocidas o estudiadas previamente de gran importancia para estudios futuros, que demostraron alta reactividad diferencial en nuestra población de estudio, sugiriendo que la inmunidad protectora contra los parásitos de malaria es compleja y dependiente de la respuesta inmune simultánea contra un panel grande de antígenos de *P. falciparum*, como previamente fue descrito en inmunidad protectora anti-esporozoito [104]. Se sugiere que estos nuevos antígenos de *P. falciparum* identificados podrían ser útiles en intervenciones seroepidemiológicas a gran escala en regiones de transmisión de malaria. Por otro lado, con la ventaja de haber identificado proteínas inmunodominantes reconocidas diferencialmente por pacientes sintomáticos e individuos asintomáticos, se sugiere que estas proteínas podrían ser útiles como nuevos marcadores para diferenciar ambos grupos de estudio.

Si bien esta tesis abarca aspectos claves de la respuesta específica de las células mononucleares frente a diferentes antígenos de *P. falciparum*, así también, el estudio de las poblaciones celulares encargadas de la activación de la respuesta inmune efectora y regulatoria lo que conlleva a la respuesta inmune protectora mediada por anticuerpos en individuos sintomáticos y asintomáticos con infección por *P. falciparum*, los resultados obtenidos dan importantes alcances que merecen investigaciones adicionales para corroborar a nivel funcional la actividad y

comportamiento de las poblaciones celulares protagonistas de la respuestas que dirigen a cada individuo hacia la inmunidad clínica, considerando factores importantes como el parásito, el hospedero y el número de infecciones adquiridas.

Uno de los aspectos más importantes para la comparación de la respuesta inmune celular y humoral entre sintomáticos y asintomáticos en comunidades endémicas a *P. falciparum* y *P. vivax* de la Amazonía peruana, es la definición clara de asintomatología en malaria y con esto el planteamiento de estrategias de captación, diagnóstico y seguimiento de los individuos infectados ya que los síntomas pueden o no aparecer lo largo del tiempo y esto depende de factores principalmente inmunológicos.

Finalmente, en esta tesis el enrolamiento de los individuos asintomáticos se ha llevado a cabo haciendo uso, no solo de técnicas moleculares altamente sensibles para el diagnóstico sino también, planteando estrategias de seguimiento que pueden resultar costosos pero que dan una aproximación más real de este estatus clínico en esta zona de estudio.

REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO) Malaria. World Malaria Report. 2014.
2. Legua P. Malaria en el Peru. Rev Med Herediana. 1994; 5(3): 115-17.
3. Neyra D, Cabezas C, Ruebush T. El Proceso de adecuación y cambio en la política del tratamiento de la malaria por Plasmodium falciparum en el Peru, 1999-2001. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2003; 20 (3): 162-171.
4. Dirección General de Epidemiología (DGE) del Ministerio de la Salud (MINSA). Boletín Epidemiológico de Malaria. Semana 1 del 2015.
5. National Institute of Allergy and Infectious Diseases [Internet]. Malaria: Life Cycle of the Malaria Parasite. Actualizado el 3 de Abril de 2012; Citado el 29 de Enero de 2015. Disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx>
6. Orjih AU. Maturation of Plasmodium falciparum in multiply infected erythrocytes and the potential role in malaria pathogenesis. Parasitol Res. 2014; 113: 4045-4056.
7. Marcus B. Malaria: Deadly diseases and Epidemics. 2nd edition. USA: Infobase Publishing; 2009.
8. Lindblade K, et al. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 11:623–639.
9. Alves FP, et al. High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66:641–648.
10. Pinto J, et al. Malaria in Sao Tome and Principe: parasite prevalences and vector densities. Acta Trop. 2000; 76:185–193.
11. Lin J, Sounders D, Meshnick S. The role of submicroscopic malaria in malaria transmission: What is the evidence?. Trends Parasitol. 2014; 30:183-190.
12. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. Clin Microbiol Rev. 2011; 24:377–410.
13. Males S, et al. Long-term asymptomatic carriage of Plasmodium falciparum protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. Clin Infect Dis. 2008; 46:516–522.

14. Bottius E, et al. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90:15–19.
15. Doolan DL, et al. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22:13–36.
16. Okell LC, et al. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009; 200:1509–1517.
17. Laishram DD, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 2012; 11:29.
18. da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the ‘symptomatic’ vs ‘asymptomatic’ dichotomy. *Mem.rias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2007; 102:341–348.
19. Branch O, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal.* 2005; 4:27.
20. Intechopen.com [Internet]. Kinyanjui SM. The Immunology of Malaria. Actualizado el 30 de Marzo de 2012; Citado el 6 de Febrero de 2015. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/34364.pdf>
21. Wykes M, Good M. What really happens to dendritic cells during malaria?. *Nature.* 2008; 6: 864-870.
22. Wykes M. Are plasmacytoid dendritic cells the misguided sentinels of malarial immunity? *Trends in Parasitol.* 2012; 28(5): 182-186.
23. Hafalla J, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunological Reviews.* 2011; 240: 297-316.
24. Roetyneck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cells and malaria. *Immunological Reviews.* 2006; 214: 251-263.
25. Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword: The role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Seminars in Immunology.* 2009: 1-10.
26. Chen Q, Amaladoss A, Ye W, Liu M, Dummler S, Kong F, et al. Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *PNAS.* 2014; 111(4): 1479-1484.
27. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the Immune System in Humans. *Chem Immunol.* 2002; 80: 229-242.
28. Janeway CA, Travers P, Walport M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Principles of innate and adaptive immunity. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>

29. Eldin S. T cell and antibody responses in Plasmodium falciparum malaria and their relation to disease susceptibility [Tesis Doctoral]. Department of Immunology, the Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm, Sweden. 2005.
30. Perez-Mazliah D, Langhorne J. CD4T-cell subsets in malaria: Th1/Th2 revisited. *Frontiers in Immunology*. 2015; 5(671): 1-8.
31. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the Immune System in Humans. *Chem Immunol*. 2002; 80: 229-242.
32. Spence PJ, Langhorne J. T cell control of malaria pathogenesis. *Current Opinion in Immunology*. 2012; 24: 444-448.
33. Stevenson M, Ing R, Berretta F, Miu J. Regulating the Adaptive Immune Response to Blood-Stage Malaria: Role of Dendritic Cells and CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7(9):1311-1322.
34. Calarota S, Baldanti F. Enumeration and Characterization of Human Memory T Cells by Enzyme-Linked Immunospot Assays. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013; 1-8.
35. Greenwood B. What can the residents of malaria endemic countries do to protect themselves against malaria?. *Parassitologia*. 1999;41(1-3):295-91999.
36. Sun T, Holowka T, Song Y, Zierow S, Leng L, Chen Y, Xiong H, Griffith J, Nouriaie M, Thuma P, Lolis E, Janse CJ, Gordeuk VR, Augustijn K, Bucala R. A Plasmodium-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:E2117-26
37. Leoratti F, Durlacher R, Lacerda M, Alecrim M, Ferreira A, Sanchez M and Moraes S. Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Mal J*. 2008; 7:186.
38. Medeiros M, Fotoran W, dalla Martha R, Katsuragawa T, Pereira da Silva L, Wunderlich G. Natural antibody response to Plasmodium falciparum merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:608.
39. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, et al. Anti-Plasmodium falciparum invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malar J* 2012; 11:361.
40. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, et al. Submicroscopic and asymptomatic Plasmodiumfalciparum and Plasmodium vivax infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Mal J. Mal J*. 2015;14:162.
41. Daou M, Kouriba B, Ouédraogo N, Diarra I, Arama C, Keita Y, Sissoko S, Ouologuem B, Arama S, Bousema T, Doumbo OK, Sauerwein RW, Scholzen A. Protection of Malian

children from clinical **malaria** is associated with recognition of multiple antigens. *Malar J.* 2015;14:56.

42. Guiyedi V, Bécavin C, Herbert F, Gray J, Cazenave PA, Kombila M, Crisanti A, Fesel C, Pied S¹. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children is associated with increased auto-antibody production, high IL-10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. *Malar J.* 2015;14:162.

43. Wammes L, Wiria A, Toenhake C, Hamid F, Yeng K, Suryani H, Kaisar M, et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune response. *J Infect Dis* 2013; 207:1590-1599.

44. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2002;169:2956–63

45. Branch O, Udhayakumar V, Hightower A, Oloo A, Hawley W, Nahlen B, Bloland P, Kaslow D, Lal A. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *AmJTrop Med Hyg.* 1998;58:211–219

46. Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med.* 1994;180:389–393.

47. Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwartz RT. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;75:131–143.

48. Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus P, Syed SE, Uthaipibull C, Holder AA, Feeney J. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol.* 1999;289:113–122.

49. Lyon JA, Angov E, Fay MP, Sullivan JS, Girourd AS, Robinson SJ, Bergmann-Leitner ES, Duncan EH, Darko CA, Collins WE, Long CA, Barnwell JW. Protection induced by *Plasmodium falciparum* MSP1(42) is strain-specific, antigen and adjuvant dependent, and correlates with antibody responses. *PLoS One.* 2008;3:e2830.

50. Olivier M, Van K, Shio M, Kassa F, Fougeray S. Malaria pigment hemozoin and the innate inflammatory response. *Frontiers in Immunology.* 2014; 5(25): 1-10.

51. Slater A. Malaria pigment. *Exp Parasitol.* 1992;74:362–365.

52. Arese P, Schwarzer E. Malarial pigmento (haemozoin): a very active ‘inert’ substance. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997;91:501–516.

53. Hänscheid T, Egan T, Grobusch M. Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(10):675-85.
54. Coban C, Ishii K, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawai T, Takeuchi O, Hisaeda H, Horii T, Akira S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol.* 2007;19(1):67-79.
55. Biswas S, Karmarkar M, Sharma Y. Antibodies detected against *Plasmodium falciparum* haemozoin with inhibitory properties to cytokine production. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;194(2):175-9.
56. Coban C, Ishii K, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005;201(1):19-25.
57. Parroche P, Lauw F, Goutagny N, Latz E, Monks B, Visintin A, Halmen K, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu D, Gazzinelli R, Golenbock D. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(6):1919-24.
58. Coban C, Igari Y, Yagi M, Reimer T, Koyama S, Aoshi T, Ohata K, Tsukui T, Takeshita F, Sakurai K, Ikegami T, Nakagawa A, Horii T, Nuñez G, Ishii K, Akira S. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe.* 2010;7(1):50-61.
59. Wu X, Gowda N, Kumar S, Gowda D. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol.* 2010;184(8):4338-48.
60. Zhu J, Krishnegowda G, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8617-8627.
61. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, Peterson LR, Kaul KL. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2435-2440.
62. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. 2002; *Genome Biology* 3: 1-12.
63. Keller C.C. et al. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect Immun.* 2006;74(9):5249-60.

64. Ho M. et al. Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis.* 1998;178(2):520–5.
65. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Kazembe J, et al. Cytokines and malaria parasitemia. *Clin Immunol.* 2001;100:208e18.
66. Moormann AM, Sumba PO, Chelimo K, Fang H, Tisch DJ, Dent AE, John CC, Long CA, Vulule J, Kazura JW. Humoral and cellular immunity to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 and protection from infection with blood-stage parasites. *J Infect Dis.* 2013 Jul;208(1):149-58.
67. Deshpande P, Shastry P. Modulation of cytokine profiles by malaria pigment--hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC. *Cytokine.* 2004;28(6):205-13.
68. Plebanski M, Flanagan KL, Lee EA, Reece WH, Hart K, Gelder C, et al. Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell epitope of Plasmodium falciparum. *Immunity.* 1999;10:651e60.
69. Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004;10:29–30.
70. Hansen DS, Schofield L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000771.
71. Adalid-Peralta L, Fragoso G, Fleury A, Scitutto E. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int J Biol Sci.* 2011;7(9):1412-26.
72. Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, Silber AM, Kallas EG, Ferreira MU, Scopel KK. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun.* 2010;78:4763–4772.
73. Butler N, Harris T, Blader I. Regulation of immunopathogenesis during Plasmodium and Toxoplasma infections: more parallels than distinctions?. *Trends Parasitol.* 2013;29(12):593-602.
74. Rossi M, Young J. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1373-81.
75. Giusti P, Urban B, Frascaroli G, Albrecht L, Tinti A, Troye-Blomberg M, Varani S. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and beta-hematin induce partial maturation of human dendritic cells and increase their migratory ability in response to lymphoid chemokines. *Infect Immun.* 2011;79(7):2727-36.

76. Diallo M, Aldebert D, Moreau J, Ndiaye M, Jambou R. Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women. *Int J Parasitol.* 2008;38(13):1557-65.
77. Pinzon-Charry A, Woodberry T, Kienzle V, McPhun V, Minigo G, Lampah D, Kenangalem E, Engwerda C, López J, Anstey N, Good M. Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. *J Exp Med.* 2013;210(8):1635-46.
78. Urban B, Todryk S. Malaria pigment paralyzes dendritic cells. *J Biol.* 2006;5(2):4.
79. Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kum-arb U, Hemmi H, Akira S, Krieg A, Heppner DG, Stewart V, Hasegawa H, Looareesuwan S, Shanks G, Miller R. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol.* 2004;172(8):4926-33.
80. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, Hisaeda H, Troye-Blomberg M, Cui L, Udomsangpetch R. Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:2697–2705.
81. Wykes M. Are plasmacytoid dendritic cells the misguided sentinels of malarial immunity?. *Trends Parasitol.* 2012;28(5):182-6.
82. Martín P, Del Hoyo GM, Anjuère F, Arias CF, Vargas HH, Fernández-L A, Parrillas V, Ardavín C. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 α ⁺ B220⁺ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood.* 2002 Jul 15;100(2):383-90.
83. Wykes M, Horne-Debets J. Dendritic cells: the Trojan horse of malaria?. *Int J Parasitol.* 2012;42(6):583-7.
84. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, et al. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 6958–63.
85. Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, Clemente A, Maggi L, Mangano VD, Verra F, Bancone G, Nebie I, Sirima BS, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Severini C, Sannella AR, Bonini P, Lucibello M, Maggi E, Garaci E, Coluzzi M, Cozzolino F, Annunziato F, Romagnani S, Modiano D. Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to Plasmodium falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:646–651.
86. Bueno LL, Morais CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Plasmodium vivax: induction of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One.* 2010;5:e9623.
87. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, Flavell RA, de Souza JB, Riley EM. IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁺ adaptive regulatory T cells

modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000004.

88. Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology.* 1997;91:536–540.

89. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, Lawrence E, Ngwa-Amambua A, Jayasooriya S, Cheeseman IH, Gomez-Escobar N, Okebe J, Conway DJ, Riley EM. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000364.

90. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, Price RN, Engwerda CR, Anstey NM, Plebanski M. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000402.

91. Scholzen A, Minigo G, Plebanski M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends Parasitol.* 2010;26:16–25.

92. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961; 192:733–7.

93. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Ann Rev Immunol* 2014; 32:157–87.

94. Sergent E, Parrot L. Premunition in bovine piroplasmiasis and human malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1950; 44:329–30.

95. Vinetz JM, Gilman RH. Asymptomatic *Plasmodium* parasitemia and the ecology of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:639–40.

96. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, et al. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69:45–52.

97. Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet* 1999; 353:1415–6.

98. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol* 2005;42:777–9.

99. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, et al. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infect Immun* 2012; 80:1583–92.

100. Baldi P, Long AD. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 2001; 17:509–19.

101. Diez-Silva M, Park Y, Huang S, et al. Pf155/RESA protein influences the dynamic microcirculatory behavior of ring-stage *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Sci Rep*; 2:614.
102. Silva MD, Cooke BM, Guillotte M, et al. A role for the *Plasmodium falciparum* RESA protein in resistance against heat shock demonstrated using gene disruption. *Mol Microbiol* 2005; 56:990–1003.
103. Park DJ, Lukens AK, Neafsey DE, et al. Sequence-based association and selection scans identify drug resistance loci in the *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 13052–7.
104. Trieu A, Kayala MA, Burk C, et al. Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10:M111.007948.
105. Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto-Cornejo KE, Gamboa D, Branch OH. Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1–19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malar J* 2008; 7:173.
106. Chuquiyaury R, Molina D, Moss E, Wang R, Gardner M, Brouwer K, Torres S, Gilman R, Llanos-Cuentas A, Neafsey D, Felgner P, Liang X, Vinetz J. Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in *Plasmodium vivax* Relapse and Reinfection. 2015. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Jul 6. pii: 15-0232. [Epub ahead of print]

DATOS SUPLEMENTARIOS

Tabla 1. Niveles de citoquinas en S, AS y C detectado por el kit FlowCytomix human Th1/Th2 11 plex

Citoquinas	Nivel más bajo detectable (pg/mL)	Niveles en los 3 grupos, mediana (rango) en pg/mL			Valor p (Test Mann-Whitney U)		
		S	AS	C	S vs AS	S vs C	AS vs C
IL-12	1.5	Todos ≤ 1.5	Todos ≤ 1.5	Todos ≤ 1.5	-	-	-
IFN- γ	1.6	1 (1- 41063)	1 (1- 42037)	1 (1- 247)	0.0249	0.0039	0.3324
IL-10	1.9	938.7 (0.1 - 12304.6)	217.8 (1 -79300.9)	112.1 (1 - 38733.5)	0.8174	0.5019	0.6354
IL-8	0.5	Todos >10000	Todos >10000	Todos >10000	-	-	-
IL-6	1.2	Todos >20000	Todos >20000	Todos >20000	-	-	-
IL-4	20.8	Todos ≤ 20.8	Todos ≤ 20.8	Todos ≤ 20.8	-	-	-
IL-5	1.6	Todos ≤ 1.6	Todos ≤ 1.6	Todos ≤ 1.6	-	-	-
IL-1 β	4.2	Todos >20000	Todos >20000	Todos >20000	-	-	-
TNF- α	3.2	Todos >20000	Todos >20000	Todos >20000	-	-	-
TGF- β		0 (0 – 44.1)	3.8 (0 – 148.7)	3.1 (0 – 331.7)	0.00001	0.00001	0.6007

Tabla 2. Demografía y características clínicas de los participantes en el estudio de la estimulación *ex vivo*.

Estatus clínico de las infecciones con <i>P. falciparum</i>						
Características	Sintomáticos (S)	Asintomáticos (AS)	Controles (C)	Valor P (C vs. S)	Valor P (C vs. AS)	Valor P (S vs. AS)
No. de sujetos	n = 14	n = 13	n = 12			
Edad (año) (mediana [rango])	31 [18-58]	36 [18-52]	34 [18-55]	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Género (% hombres)	56%	51.3%	59%	> 0.05	> 0.05	> 0.05
No. de Leucocitos ($10^9/L$) (mediana [rango])	4.4 [4.0-5.8]	5.9 [4.9-7.9]	5.7 [4.2-7.2]	0.016	> 0.05	0.0020
No. de Linfocitos ($10^9/L$) (mediana [rango])	1.33 [0.87-2.2]	1.91 [1.1-2.76]	2.4 [1.72-2.91]	0.0054	> 0.05	0.018
Parasitemia (no. de parásitos ml^{-1})	2125 [125-49852]	1 [1-3373]	NA	NA	NA	0.0001

Los valores p provienen de la prueba Mann–Whitney U (para comparar dos grupos no paramétricos).

La proporción de hombres fue comparada por la prueba Chi-square.

